



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

TRATAMENTO ÁCIDO NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA: EFEITO SOBRE A  
VIABILIDADE E VITALIDADE DE LINHAGENS INDUSTRIAIS DE *Saccharomyces*  
*cerevisiae*

GABRIEL SCANAVACHI DE JESUS

Araras  
2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**TRATAMENTO ÁCIDO NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA: EFEITO SOBRE A  
VIABILIDADE E VITALIDADE DE LINHAGENS INDUSTRIAIS DE *Saccharomyces  
cerevisiae***

**GABRIEL SCANAVACHI DE JESUS**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Produção  
Vegetal e Bioprocessos Associados  
como requisito parcial à obtenção do  
título de MESTRE EM PRODUÇÃO  
VEGETAL E BIOPROCESSOS  
ASSOCIADOS

Araras

2025

Jesus, Gabriel Scanavachi de

Tratamento ácido na fermentação etanólica: efeito sobre a viabilidade e vitalidade de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* / Gabriel Scanavachi de Jesus -- 2025.

58f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Sandra Regina Ceccato Antonini

Banca Examinadora: Sandra Regina Ceccato Antonini, Reinaldo Gaspar Bastos, Marcelo Augusto de Souza Costa

Bibliografia

1. Microbiologia da fermentação etanólica. 2. Viabilidade celular. 3. Vitalidade celular. I. Jesus, Gabriel Scanavachi de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8  
7083



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Gabriel Scanavachi de Jesus, realizada em 06/10/2025.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini (UFSCar)

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos (UFSCar)

Prof. Dr. Marcelo Augusto de Souza Costa (UEMS)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

## AGRADECIMENTOS

Ao longo do mestrado, enfrentei inúmeros desafios que, acima de tudo, revelaram a força que somos capazes de carregar e a contínua possibilidade de crescimento e de esperança. A todos que me acompanharam nesta trajetória, deixo meus mais sinceros e profundos agradecimentos.

À minha família — ao meu pai, Carlos; à minha mãe, Luciene; e aos meus irmãos, Camila e Miguel — agradeço pelo amor, pela compreensão nas horas de ausência e pelas palavras que me sustentaram nos momentos em que precisei seguir em frente. Sem o apoio incondicional de vocês, esta conquista não teria sido possível.

À minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, expresso minha mais profunda gratidão pela orientação atenciosa, pela paciência e pelas críticas sempre construtivas. Obrigado por acreditar no projeto, por compartilhar seu conhecimento e por orientar com rigor científico e sensibilidade humana em todos os momentos. Você é uma inspiração para todos à sua volta.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Gazaffi, agradeço pela orientação nos testes estatísticos.

Aos companheiros de laboratório — Bianca, Bruna, Cecília, Neto, Judieldo e Julienny — manifesto minha sincera gratidão. A convivência com vocês tornou tudo mais leve e o trabalho mais prazeroso; agradeço pela ajuda prática, pelas discussões científicas e pelo companheirismo diário.

À CAPES (Demanda Social) e à FAI-UFSCar (Bolsa de extensão Diretoria CCA-UFSCar), agradeço pela concessão do apoio financeiro na forma de bolsas que tornou possível a realização deste projeto. Agradeço também à Coordenação e à Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados pelo auxílio recorrente, pela atenção administrativa e pelo suporte operacional em todas as etapas deste trabalho.

Aos amigos que compartilharam risos, conselhos e momentos durante estes anos de mestrado, meu muito obrigado. Vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui e para celebrar cada pequena vitória ao longo do caminho. A amizade de vocês enriqueceu esta jornada e me inspira a sempre buscar o meu melhor. Sempre foi por vocês, e sempre será.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	4
2.1 Objetivo geral .....	4
2.2 Objetivos específicos .....	4
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
3.1 O processo de fermentação alcoólica no Brasil .....	5
3.2 Fatores que influenciam a levedura na fermentação .....	6
3.3 Tratamento celular com ácido sulfúrico na fermentação .....	9
3.4 Viabilidade e vitalidade celular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
<b>4 MATERIAIS E METODOS</b> .....	15
4.1 Microrganismos.....	15
4.2 Fermentação em batelada com reciclo celular e tratamento ácido .....	15
4.3 Análises de viabilidade e vitalidade celular .....	16
4.3.1 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) .....	16
4.3.2 Coloração com corante Eritrosina .....	16
4.3.3 Crescimento em meio líquido.....	17
4.3.4 Contagem de cicatrizes de brotamento.....	18
4.4 Análise da fermentação.....	19
4.5 Análise estatística .....	19
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
5.1 Efeito do tratamento ácido sobre a levedura industrial PE-2.....	21
5.2 Efeito do tratamento ácido sobre a levedura industrial CAT-1 .....	30
5.3 Análise comparativa do efeito do tratamento ácido sobre as linhagens industriais PE-2 e CAT-1 .....	37
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	42
<b>7 LITERATURA CITADA</b> .....	43

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais fatores que afetam diretamente o processo de crescimento da levedura e sua capacidade fermentativa <sup>1</sup> . . . . .	6
<b>Tabela 2.</b> Principais métodos utilizados em processos fermentativos para determinação de viabilidade celular <sup>1</sup> . . . . .	11
<b>Tabela 3.</b> Principais métodos utilizados em processos fermentativos para determinação de vitalidade celular <sup>1</sup> . . . . .	12
<b>Tabela 4.</b> Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (seis ciclos fermentativos) da linhagem industrial PE-2 em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5). . . . .	23
<b>Tabela 5.</b> Resultado da análise estatística dos parâmetros analisados quanto ao crescimento em meio semissintético (YPD) das células da linhagem industrial PE-2 amostradas da fermentação em batelada alimentada com reciclo celular, após os ciclos fermentativos 1 e 6, em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5)... . . . .	25
<b>Tabela 6.</b> Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (seis ciclos fermentativos) da levedura industrial CAT-1 em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5). . . . .	32
<b>Tabela 7.</b> Resultado da análise estatística dos parâmetros analisados quanto ao crescimento em meio semissintético (YPD) das células da linhagem industrial CAT-1 amostradas da fermentação em batelada alimentada com reciclo celular, após os ciclos fermentativos 1 e 6, em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5). . . . .	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Visualização de células de *S. cerevisiae* das cepas industriais PE-2 (à esquerda) e CAT-1 (à direita), coradas com *Calcofluor White M2R*. O corante se liga à quitina, evidenciando as cicatrizes de brotamento (setas), que aparecem como regiões fluorescentes na parede celular. Os números indicam a quantidade de cicatrizes observadas por célula. . . . . 18
- Figura 2.** Log do número de UFC/mL, log do número de células/mL, viabilidade celular (%) e percentual de brotamento (%) da linhagem industrial PE-2 ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba. . . . . 22
- Figura 3.** Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ), variação de absorbância e duração da fase lag (h) da linhagem industrial PE-2 no estágio de pé-de-cuba (PC) e ao final dos ciclos 1 e 6 (C1 e C6) na fermentação em batelada alimentada. . . . . 25
- Figura 4.** pH final, concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL), teor alcoólico (g/100 mL) e rendimento (g etanol/g ART) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com a linhagem industrial PE-2, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. . . . . 26
- Figura 5.** Frequência de células em função do número de cicatrizes de brotamento da linhagem industrial PE-2 na fase de pé-de-cuba e após tratamento ácido (barra rosa) ou sem tratamento (barra azul) realizados após 6 ciclos na fermentação em batelada alimentada. Número total de células contadas=100. . . . . 29
- Figura 6.** Log do número de UFC/mL, log do número de células/mL, viabilidade celular (%) e taxa de brotamento (%) da linhagem industrial CAT-1 ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba. . . . . 31
- Figura 7.** Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ), variação de absorbância e duração da fase lag (h) da linhagem industrial CAT-1 no estágio de pé-de-cuba (PC) e ao final dos ciclos 1 e 6 (C1 e C6) na fermentação em batelada alimentada. . . . . 33
- Figura 8.** pH final, concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL), teor alcoólico (g/100 mL) e rendimento (g etanol/g açúcar) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com a linhagem industrial CAT-1, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. . . . . 34
- Figura 9.** Frequência de células em função do número de cicatrizes de brotamento da linhagem industrial CAT-1 na fase de pé-de-cuba e após tratamento ácido (barra

rosa) ou sem tratamento (barra azul) realizados após 6 ciclos na fermentação em batelada alimentada. Número total de células contadas=100. . . . . 36

**Figura 10.** Representação resumida dos resultados obtidos com as linhagens PE-2 e CAT-1 nas fermentações em batelada alimentada com reciclo celular com e sem tratamento ácido, em caldo de cana. Os retângulos indicam não haver diferença significativa entre as médias (considerando a média geral de todos os ciclos) enquanto os triângulos apontam diferença significativa entre as médias, separadamente para cada linhagem, ao nível de significância de 5%. . . . . 38

# TRATAMENTO ÁCIDO NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA: EFEITO SOBRE A VIABILIDADE E VITALIDADE DE LINHAGENS INDUSTRIAIS DE *Saccharomyces cerevisiae*

**Autor: GABRIEL SCANAVACHI DE JESUS**

**Orientador: Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI**

## RESUMO

O controle de microrganismos contaminantes nas indústrias sucroalcooleiras brasileiras frequentemente envolve o uso do ácido sulfúrico, que aplicado ao final de cada ciclo fermentativo não só controla as bactérias contaminantes, mas também promove a desfloculação do fermento, contribuindo para a eficiência da produção de etanol. Há poucos estudos mostrando qual é o efeito do tratamento ácido sobre as leveduras agentes do processo fermentativo, especialmente quanto à viabilidade — entendida como a proporção de células vivas capazes de reprodução — e à vitalidade — definida como a capacidade funcional e fisiológica das células para desempenhar atividades metabólicas. Neste estudo, avaliou-se o efeito do tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,5; 2 h) sobre a viabilidade e a vitalidade de células de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando as linhagens industriais PE-2 e CAT-1 em fermentação em batelada alimentada com reciclo celular, em caldo de cana, durante seis ciclos fermentativos. Foram analisados número de UFC/mL, número de células viáveis/mL (coloração com eritrosina), viabilidade (%), brotamento (%), crescimento em meio líquido e contagem de cicatrizes de brotamento, bem como teor alcoólico (g/100 mL), pH final, açúcares redutores totais residuais (g/100 mL) e rendimento (g etanol/g açúcares redutores totais), após cada ciclo de tratamento das células. Foi também conduzida fermentação sem tratamento ácido, utilizando somente água no lugar do ácido. Na linhagem PE-2, o tratamento ácido afetou significativamente a viabilidade (%), brotamento (%), velocidade específica de crescimento ( $\mu_{max}$ , h<sup>-1</sup>) e variação da absorbância. Entretanto, o rendimento fermentativo não foi comprometido pelo tratamento ácido, sugerindo um perfil adaptativo capaz de sustentar a capacidade fermentativa; já a linhagem CAT-1 apresentou maior sensibilidade ao estresse ácido, de modo que a houve influência sobre o brotamento (%), o teor alcoólico (g/100 mL) e o consumo de açúcares (g/100 mL). O aumento do brotamento ocorreu concomitantemente ao acúmulo de açúcares residuais e à redução do rendimento, indicando a priorização da sobrevivência e da divisão celular em detrimento da eficiência fermentativa. Além disso, a análise das cicatrizes de brotamento revelou evidências de seleção de células metabolicamente ativas acompanhada da morte de células jovens, comportamento que não variou de forma expressiva entre as cepas e nem entre os tratamentos. Em conjunto, esses resultados permitem concluir que, embora a linhagem CAT-1 apresente persistência ao longo dos ciclos, exibe rendimento fermentativo inferior ao da PE-2 na presença do tratamento ácido, provavelmente devido à menor tolerância ao tratamento ácido, mobilizando de forma mais acentuada estratégias de crescimento para manter a viabilidade celular durante a fermentação.

**Palavras-chave:** Biocombustível; fermentação em batelada; vitalidade; viabilidade.

## **Acid treatment in ethanol fermentation: effect on the viability and vitality of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae***

**Author: GABRIEL SCANAVACHI DE JESUS**

**Adviser: Prof. Dr. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI**

### **ABSTRACT**

The control of contaminant microorganisms in Brazilian sugar-ethanol industries frequently involves the use of sulfuric acid, which, when applied at the end of each fermentation cycle, not only controls contaminant bacteria but also promotes deflocculation of the yeast, contributing to ethanol production efficiency. Few studies have investigated the effect of acid treatment on the yeasts responsible for the fermentative process, particularly regarding viability — understood as the proportion of living cells capable of reproduction — and vitality — defined as the functional and physiological capacity of cells to carry out metabolic activities. In this study, we evaluated the effect of sulfuric acid treatment (pH 2.5; 2 h) on the viability and vitality of *Saccharomyces cerevisiae* cells, using the industrial strains PE-2 and CAT-1 in fed-batch fermentation with cell recycling, in sugarcane broth, over six fermentation cycles. We analyzed CFU/mL, number of viable cells/mL (erythrosine staining), viability (%), budding (%), growth in liquid medium and counting of bud scars, as well as alcohol content (g/100 mL), final pH, residual total reducing sugars (g/100 mL) and yield (g ethanol/g total reducing sugars) after each cycle of cell treatment. A control fermentation without acid treatment was also conducted, using water in place of the acid. In the PE-2 strain, acid treatment significantly affected viability (%), budding (%), specific growth rate ( $\mu_{max}$ ,  $h^{-1}$ ) and change in absorbance. However, fermentative yield was not compromised by the acid treatment, suggesting an adaptive profile capable of sustaining fermentative capacity; in contrast, the CAT-1 strain showed greater sensitivity to acid stress, with effects on budding (%), alcohol content (g/100 mL) and sugar consumption (g/100 mL). The increase in budding occurred concomitantly with accumulation of residual sugars and reduction in yield, indicating a prioritization of survival and cell division at the expense of fermentative efficiency. Moreover, analysis of bud scars revealed evidence of selection for metabolically active cells accompanied by death of young cells, a behavior that did not vary markedly between strains or treatments. Taken together, these results indicate that, although the CAT-1 strain persists across cycles, it exhibits a lower fermentative yield than PE-2 in the presence of acid treatment, probably due to lower tolerance to the acid treatment and a stronger mobilization of growth strategies to maintain cell viability during fermentation.

**Key-words:** Biofuel; batch fermentation; vitality; viability.

## 1 INTRODUÇÃO

A vitalidade e a viabilidade celular são parâmetros centrais em qualquer bioprocessamento. A viabilidade diz respeito à capacidade do microrganismo de sobreviver, proliferar e estabelecer novas colônias, enquanto a vitalidade descreve o vigor fisiológico das células e sua aptidão para executar funções metabólicas essenciais. Embora distintos autores apresentem definições variadas para esses termos, tanto a viabilidade quanto a vitalidade exercem influência direta sobre a eficiência e a produtividade dos processos fermentativos, uma vez que o rendimento microbiano está intimamente ligado ao estado fisiológico da população celular.

No setor de bioprocessos, microrganismos como bactérias e leveduras são amplamente utilizados devido à capacidade de converterem matérias-primas renováveis em produtos de alto valor agregado, como ácidos orgânicos, enzimas, biomassa microbiana e biocombustíveis, incluindo o etanol. Em fermentações industriais, avaliar a viabilidade e vitalidade celular permite monitorar as populações microbianas e sua resistência a condições adversas, como variações de pH, temperatura e presença de compostos tóxicos. Essas análises fornecem informações importantes para ajustes que potencializem a eficiência dos processos.

Entre os diversos microrganismos utilizados, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* se destaca como principal agente fermentador na produção de etanol, devido à tolerância a estresses ambientais e à capacidade fermentativa. No Brasil, a produção de etanol desempenha um papel estratégico tanto no setor energético quanto no econômico, consolidando o país como um dos maiores produtores mundiais deste biocombustível. A maior parte do etanol brasileiro é produzido a partir da cana-de-açúcar, um recurso renovável amplamente cultivado em diversas regiões do país. Esse modelo de produção, baseado no conceito de biorrefinaria, permite o aproveitamento integral da biomassa da cana, resultando em produtos como o etanol hidratado e o anidro, utilizados como combustível veicular ou aditivo na gasolina.

Nas usinas brasileiras de etanol, um dos aspectos operacionais que contribui para a elevada produtividade dos bioprocessos fermentativos é o sistema de reciclo celular. Nesse método, após cada ciclo fermentativo, as células de levedura são recuperadas e reutilizadas em novos ciclos, garantindo um alto rendimento e reduzindo a necessidade de inoculação constante de novas culturas. Essa prática é vantajosa para manter a concentração celular elevada e favorecer a adaptação das células ao processo fermentativo, fator determinante para a eficiência da fermentação em larga escala. Entretanto, o reciclo celular apresenta um desafio significativo relacionado à contaminação microbiana. Ao longo dos ciclos, microrganismos indesejáveis podem se acumular e competir pelo substrato fermentável,

prejudicando o desempenho das células de *S. cerevisiae*. Além disso, o acúmulo de células senescentes, que possuem menor atividade metabólica, também pode afetar a eficiência global do processo.

Deste modo, embora o reciclo celular seja uma prática comum e vantajosa para aumentar a produtividade, ele também intensifica a necessidade de estratégias eficazes de controle microbiológico para mitigar contaminantes. Mesmo em condições controladas, o acúmulo de subprodutos tóxicos e o envelhecimento celular podem comprometer a viabilidade e vitalidade da comunidade de leveduras. Além disso, microrganismos indesejáveis agravam esse quadro ao competir pelo substrato e gerar metabólitos tóxicos, reduzindo ainda mais a eficiência fermentativa.

A contaminação microbiana configura-se como um significativo desafio à produção de etanol no Brasil, indo desde as etapas iniciais no campo até o processo de fermentação. Microrganismos contaminantes, como bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, comprometem a eficiência do processo ao competir com *S. cerevisiae* e produzir compostos que inibem a atividade fermentativa. Esse cenário, associado às condições não assépticas predominantes nas usinas, resulta em perdas significativas de produtividade e reforça a necessidade de práticas eficazes de controle microbiológico.

Entre as principais estratégias de controle utilizadas no setor sucroalcooleiro destacam-se o uso de antibióticos e o tratamento com ácido sulfúrico. Antibióticos como penicilina, tetraciclina e monensina inibem bactérias indesejáveis, permitindo que a fermentação ocorra de maneira mais eficiente. No entanto, seu uso enfrenta restrições devido às preocupações ambientais e ao risco de resistência microbiana em áreas próximas às indústrias. Isso tem motivado a busca por alternativas mais seguras e sustentáveis.

O tratamento com ácido sulfúrico, por sua vez, é amplamente utilizado ao final de cada ciclo fermentativo para reduzir as populações de bactérias contaminantes. Apesar de sua eficácia comprovada, a aplicação dessa técnica requer precauções quanto ao transporte, armazenamento e manuseio seguro do ácido, o que pode impactar a operacionalidade do processo. Além do controle microbiológico, o tratamento com ácido sulfúrico proporciona benefícios adicionais, como a desfloculação do fermento e possível remoção de células senescentes.

Embora sejam escassos os estudos experimentais que comprovem a eficácia do ácido sulfúrico na eliminação de células envelhecidas e frágeis, é possível que o dano celular relacionado à idade se acumule ao longo do tempo, comprometendo diversas atividades biológicas. Por esse motivo, é essencial investigar a relação entre esses fatores e validar os efeitos do tratamento com ácido sulfúrico durante a fermentação.

Em vista disso, o monitoramento do estado fisiológico das leveduras ao longo do processo fermentativo surge como uma estratégia promissora para garantir maior

estabilidade e produtividade na produção de etanol. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com ácido sulfúrico sobre a vitalidade e a viabilidade celular durante a fermentação etanólica em batelada alimentada com reciclo celular. Busca-se compreender de que forma esse tratamento pode influenciar o desempenho da levedura *S. cerevisiae*, contribuindo para a melhoria da eficiência fermentativa e a sustentabilidade do processo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com ácido sulfúrico sobre a viabilidade e vitalidade das linhagens industriais de *S. cerevisiae* (PE-2 e CAT-1) durante o processo fermentativo ao longo dos ciclos de tratamento.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar parâmetros/variáveis fermentativos das linhagens industriais de *S. cerevisiae* (teor alcoólico, açúcares redutores totais, pH e rendimento) ao final de cada ciclo fermentativo (total de 6), em fermentações com e sem tratamento com ácido sulfúrico, em caldo de cana;
- Avaliar a viabilidade celular e vitalidade por meio da quantificação do número de células viáveis por diluição seriada e plaqueamento, contagem direta de células após coloração com eritrosina, crescimento das células em meio líquido, número de cicatrizes de brotamento e percentuais de brotamento e viabilidade, ao final de cada ciclo fermentativo (total de 6), em fermentações com e sem tratamento com ácido sulfúrico, em caldo de cana;
- Comparar as linhagens industriais PE-2 e CAT-1 quanto aos efeitos do tratamento ácido sobre a viabilidade e vitalidade das linhagens.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 O processo de fermentação alcoólica no Brasil

A fermentação alcoólica é um processo biológico anaeróbio no qual açúcares simples, como glicose, frutose e sacarose, são metabolizados, resultando na produção de etanol e dióxido de carbono como produtos (Lima; Marcondes, 2002). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo predominante nesse processo industrial, em razão de sua eficiência na conversão de açúcares em etanol e de sua robustez frente às condições estressantes típicas da fermentação etanólica, como as altas concentrações de álcool, as variações de temperatura, o baixo pH e a pressão osmótica do meio (Ceccato-Antonini, 2021).

No Brasil, a eficiência fermentativa depende da qualidade do substrato, das condições do meio e da adaptação da levedura ao sistema operacional (Paschoalini; Alcarde, 2009). A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima, fornecendo caldo e melaço com alta concentração de sacarose; o melaço, por sua vez, é um subproduto do refino do açúcar e apresenta composição distinta do caldo, o que influencia a nutrição e o comportamento da levedura (Amorim; Basso; Lopes, 2009). Essas matérias-primas têm a vantagem de dispensar pré-tratamentos enzimáticos complexos, simplificando a operação industrial e reduzindo custos (Batistote *et al.*, 2010; Goldemberg, 2007).

O processo conhecido como *Méle-Boicot* é amplamente utilizado na indústria de etanol no Brasil e caracteriza-se pelo reciclo das células de levedura para os ciclos fermentativos subsequentes (Lopes *et al.*, 2016). O sistema de reciclo celular aliado ao modelo de condução do processo por batelada alimentada destacam-se como características marcantes da produção brasileira de etanol (Pacheco, 2010). O modelo de batelada alimentada confere maior flexibilidade operacional e permite ciclos fermentativos mais rápidos, uma vez que possibilita o controle rigoroso da concentração de açúcar no meio, minimizando efeitos inibitórios e maximizando a taxa de conversão. Isso se reflete em maior produtividade média quando comparado ao processo contínuo (Godoy *et al.*, 2008). Apesar disso, o sistema contínuo apresenta vantagens econômicas e de automação, com custos de implantação reportados como 50–60% inferiores aos do modelo em batelada alimentada (Ceccato-Antonini, 2021). Assim, a escolha do regime operacional resulta de um balanço entre custo, controle de processo e robustez operacional.

Em escala industrial, as dornas brasileiras costumam variar entre 0,5 e 3 milhões de litros. Durante a safra — aproximadamente 200–300 dias por ano — registram-se entre 400 e 600 ciclos fermentativos, com duração média de 6 a 12 horas cada. As concentrações celulares típicas são relatadas na faixa de 10–15% (m/v), e o vinho pós-fermentação

apresenta teor alcoólico final entre 7% e 11% (v/v), com glicose residual frequentemente inferior a 0,01% (Amorim; Basso; Lopes, 2009; Ceccato-Antonini, 2021).

Ao término de cada ciclo, as células são separadas do vinho por centrifugação e submetidas a procedimentos de tratamento com ácido sulfúrico antes de seu retorno à dorna para o próximo ciclo; o vinho segue para destilação e processamento subsequente (Lopes *et al.*, 2016).

### 3.2 Fatores que influenciam a levedura na fermentação

As condições operacionais do processo fermentativo impõem múltiplos desafios às leveduras, afetando tanto sua capacidade de fermentar quanto seu crescimento (Ceccato-Antonini, 2021). Entre os fatores determinantes destacam-se: pH baixo, variações de temperatura nas dornas, alta pressão osmótica, elevadas concentrações de etanol, composição do mosto e presença de contaminantes em níveis relevantes; tais efeitos são frequentemente intensificados pelo reciclo celular e por eventuais tratamentos do fermento (Basso; Basso; Rocha, 2011). A Tabela 1 sintetiza os principais fatores e seus impactos sobre a fisiologia e a produtividade das leveduras.

**Tabela 1.** Principais fatores que afetam diretamente o processo de crescimento da levedura e sua capacidade fermentativa<sup>1</sup>.

Fator	Impacto nas leveduras
Baixo pH	Interfere no transporte de íons e na regulação intracelular, gerando estresse adicional.
Oscilações de temperatura	O estresse térmico pode causar desnaturação de enzimas e inativar mecanismos celulares críticos.
Pressão osmótica elevada	Compromete o transporte de nutrientes e água, afetando o metabolismo celular e reduzindo a eficiência fermentativa.
Alta concentração de etanol	Inibe o crescimento celular e afeta a viabilidade, especialmente acima de 10% (v/v).
Composição do mosto	Nutrientes insuficientes ou compostos inibitórios, como sulfito e metais pesados, afetam a eficácia fermentativa.
Presença de contaminantes	Competem com as leveduras por nutrientes e produzem compostos indesejáveis, como ácidos orgânicos e acetato.

<sup>1</sup>Baseado em Amorim; Basso; Lopes (2009); Mager; Siderius (2002); Narendranath *et al.* (1997); Oliva-Neto; Yokoya (1997); Reis *et al.* (2017).

A composição do mosto exerce influência direta no desempenho fermentativo. O caldo de cana e o melaço apresentam perfis químicos distintos: enquanto o caldo caracteriza-se por menores concentrações de compostos inibitórios, sua qualidade nutricional é suscetível a variações sazonais que podem impactar o rendimento. Em contrapartida, o melaço — subproduto da fabricação do açúcar — apresenta elevada concentração de sais e substâncias, a exemplo do sulfito, que podem ser tóxicos às leveduras em determinadas dosagens (Amorim; Basso; Lopes, 2009).

A estratégia de combinar caldo e melaço visa equilibrar o aporte nutricional e mitigar os efeitos tóxicos sobre as leveduras. Essa redução da toxicidade ocorre pela diluição de componentes inibitórios intrínsecos ao melaço, como sais e sulfitos, cujas concentrações são reduzidas a níveis toleráveis ao metabolismo celular quando misturadas ao caldo (Ceccato-Antonini, 2021). Além do equilíbrio químico, a composição do mosto misto é fundamental para o ajuste do teor de sólidos solúveis totais (°Brix); visto que o melaço possui uma concentração de açúcares excessivamente elevada, a adição de caldo permite atingir a densidade ideal de fermentação, prevenindo o estresse osmótico e assegurando a viabilidade das células ao longo dos ciclos.

Fatores químicos do meio, como baixo pH e presença de metais, afetam o metabolismo e a integridade celular. Entre os metais, sendo encontrado com relativa frequência no caldo de cana, o alumínio tem sido apontado como prejudicial, mesmo em baixas concentrações, por sua capacidade de interferir em componentes celulares essenciais (Ceccato-Antonini, 2021). Além disso, o baixo pH potencializa a toxicidade de ácidos orgânicos (por exemplo, ácido láctico e acético), que quando acumulados aumentam a vulnerabilidade das leveduras ao etanol e reduzem sua viabilidade e atividade metabólica (Oliva-Neto *et al.*, 2013).

A contaminação microbiológica constitui um risco crítico para processos industriais de produção de etanol. Espécies como *Dekkera bruxellensis* e *Limosilactobacillus fermentum* competem por substrato com a *Saccharomyces cerevisiae*, produzindo metabólitos indesejáveis (por exemplo, ácidos orgânicos e acetato) e, conseqüentemente, reduzindo o rendimento fermentativo (Bayrock; Ingledew, 2004; Bischoff *et al.*, 2009). Lucena *et al.* (2010), ao analisar 489 isolados de quatro destilarias (2007–2008), verificaram que bactérias lácticas podem atingir até  $8,9 \times 10^8$  UFC/mL nas dornas de fermentação e  $6,0 \times 10^8$  UFC/mL no caldo de cana bruto, com *L. fermentum* como a espécie mais frequente. Relatos industriais e experimentais indicam prejuízos substanciais: estimativas apontam perdas diárias da ordem de 20.000 L de etanol em condições industriais, aumentos significativos da glicose residual e quedas de rendimento de até  $\approx 27\%$  em contaminações intensas (Amorim; Basso; Lopes, 2009; Bischoff *et al.*, 2009). Esses efeitos decorrem tanto da competição direta pelo substrato quanto do acúmulo de ácido láctico, que compromete

funções metabólicas essenciais das leveduras (Narendranath *et al.*, 1997; Oliva-Neto; Yokoya, 1997).

A concentração de etanol constitui um importante fator limitante para *S. cerevisiae*: concentrações superiores a 10% (v/v) prejudicam a viabilidade celular, efeito que se intensifica em temperaturas elevadas (Reis *et al.*, 2017). A faixa térmica ideal para a fermentação industrial situa-se entre 26 °C e 35 °C; contudo, o caráter exotérmico do processo pode elevar a temperatura até aproximadamente 38 °C, o que exige sistemas de resfriamento para mitigar o estresse térmico sobre as leveduras (Lima; Basso; Amorim, 2001).

O estresse osmótico, decorrente de elevadas concentrações iniciais de açúcar, representa outro desafio crítico à fermentação. Concentrações de açúcares reductores totais (ART) superiores a 120 g/L podem provocar a perda de água celular por osmose e o comprometimento da viabilidade da levedura (Mager; Siderius, 2002). No ambiente industrial, esse parâmetro é monitorado através do teor de sólidos solúveis totais. Considerando que 120 g/L de açúcares equivalem, de maneira aproximada e simplificada, a 12° Brix, observa-se que mostos com graduações superiores elevam a pressão osmótica do meio, exigindo maior robustez da cepa para evitar a plasmólise e garantir a eficiência metabólica. Esse estresse frequentemente atua sinergicamente com a presença de ácidos orgânicos e altos teores de etanol, aumentando a toxicidade do meio. Para mitigar tais efeitos, as práticas industriais adotam sistemas de batelada alimentada, que permitem um controle mais rigoroso das condições operacionais e maior eficiência fermentativa (Graves *et al.*, 2006). A superioridade desse sistema reside, em grande parte, na promoção da adaptação celular: ao fornecer o substrato de maneira gradual, evita-se a exposição imediata das leveduras a choques osmóticos severos. Esse fornecimento controlado permite que o microrganismo ajuste seu metabolismo e a composição de sua membrana plasmática de forma progressiva, estabelecendo uma resposta adaptativa que mantém a homeostase interna e a viabilidade celular mesmo diante do incremento na concentração de etanol e de metabólitos inibitórios ao longo do ciclo. Paralelamente, avanços em seleção e melhoramento têm produzido estirpes com maior resistência a esses desafios.

Desde meados dos anos 2000, a adoção de leveduras comerciais selecionadas e adaptadas às condições locais das destilarias cresceu de importância (Ceccato-Antonini, 2021). A seleção natural por meio do reciclo celular e da exposição a estresses industriais favoreceu a predominância de linhagens adaptadas. Entre as cepas industriais amplamente utilizadas no Brasil destacam-se PE-2 e CAT-1, reconhecidas por sua capacidade de adaptação, alto rendimento fermentativo e dominância ao final dos ciclos (Basso *et al.*, 2008).

A cepa PE-2 tem sido associada à maior tolerância a ambientes ácidos, um caráter que tende a ser favorecido em processos que empregam tratamento ácido do fermento (acidificação com  $H_2SO_4$ ) durante o reciclo celular (Della-Bianca et al., 2014; Reis et al., 2017). A manutenção de altas taxas de viabilidade ao longo dos ciclos é fundamental para a estabilidade do processo e para minimizar quedas de rendimento (Amorim et al., 2011).

A viabilidade celular é um parâmetro crítico no contexto do reciclo, pois, células viáveis sustentam a continuidade dos ciclos fermentativos ao longo da safra (Ceccato-Antonini, 2021). A redução da viabilidade indica perda de tolerância ao ambiente operacional e compromete o desempenho da linhagem, sendo, portanto, um indicador valioso para intervenção operacional ou substituição de levedo (Amorim; Gryscek; Lopes, 2010).

### 3.3 Tratamento celular com ácido sulfúrico na fermentação

O controle de microrganismos contaminantes nas dornas de fermentação é essencial para assegurar a eficiência do processo. No Brasil, práticas antimicrobianas adotadas pela indústria sucroalcooleira incluem a acidificação com ácido sulfúrico e, historicamente, o uso de antibióticos, visando reduzir a carga bacteriana e preservar o desempenho fermentativo (Ceccato-Antonini, 2018). Entre essas alternativas, a acidificação com  $H_2SO_4$  aplicada ao fermento ao final de cada ciclo tem demonstrado eficácia no controle de bactérias contaminantes e na desfloculação associada a infestações bacterianas (Basso et al., 2008; Wheals et al., 1999).

A produção de etanol no Brasil enfrenta desafios significativos relacionados à contaminação microbiana, presentes desde as etapas iniciais no campo até o processo de fermentação. Esse problema é amplificado pelas condições não assépticas que caracterizam a colheita, o tratamento do substrato e a condução do bioprocessamento (Silva-Neto et al., 2020).

Microrganismos como *Lactobacillus* e *Bacillus* estão entre os contaminantes mais comuns, sendo a espécie *L. fermentum* frequentemente destacada como um dos principais responsáveis pela redução da eficiência fermentativa. A presença desse contaminante pode levar a perdas expressivas, com diminuições de até 30% no rendimento da produção de etanol (Brexó; Sant'Ana, 2017).

Após a separação do vinho das células ao término do ciclo, forma-se um “creme de leveduras” com elevada concentração de sólidos (tipicamente relatada na faixa de 60–70% m/v), que é submetido à acidificação até pH ~1,8–2,8 por períodos tipicamente entre 1,5 e 3 h antes de seu retorno à dorna. Estudos reportaram efeitos relevantes: Gallo (1989) observou redução de 44,6% no número de células bacterianas após acidificação, enquanto outros trabalhos registraram reduções de 3 ciclos log ( $\approx 99,9\%$ ) para *L. fermentum* com protocolos semelhantes (Costa; Cerri; Ceccato-Antonini, 2018; Silva-Neto et al., 2020).

Embora *S. cerevisiae* apresente maior tolerância a baixos valores de pH em comparação com muitas bactérias contaminantes, a exposição a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pode provocar danos fisiológicos em leveduras, variando conforme o estado fisiológico (fração de células jovens versus senescentes), tempo de exposição e intensidade do tratamento (Oliva-Neto *et al.*, 2013). A resistência ao estresse ácido tem sido relacionada à presença de reservas de carboidratos (glicogênio, trealose) e a mecanismos de proteção celular que mitigam a perda de integridade da membrana e o colapso metabólico (Basso *et al.*, 2008).

Alguns autores sugerem que a acidificação tende a “selecionar” subpopulações mais robustas, reduzindo a fração de células senescentes e, assim, potencialmente preservando desempenho fermentativo nos ciclos subsequentes (Gomes *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2011). Entretanto, as evidências experimentais diretas sobre a eliminação seletiva de células envelhecidas são ainda limitadas, e os efeitos sobre viabilidade, vitalidade e produtividade demandam avaliações integradas (Kamei *et al.*, 2014).

### **3.4 Viabilidade e vitalidade celular em *Saccharomyces cerevisiae***

Em diferentes áreas do conhecimento, termos como vitalidade e viabilidade podem receber definições distintas ou até divergentes dentro de uma mesma área. No campo dos microrganismos, esse desacordo é documentado por Bouix *et al.* (2022), os quais empregam as categorias culturabilidade, viabilidade e vitalidade de forma diversa daquela adotada por Kwolek-Mirek e Zadrag-Tecza (2014). Para Bouix *et al.* (2022), culturabilidade refere-se à capacidade de uma célula se dividir em meio sólido e formar colônias; viabilidade envolve integridade de membrana, capacidade de síntese proteica e produção de energia; e vitalidade diz respeito à capacidade de gerar energia, ao comportamento dinâmico da cultura e aos parâmetros cinéticos (taxas específicas de crescimento, produção de metabólitos e consumo de substrato). Assim, segundo esses autores, em uma mesma população podem coexistir células vivas — identificáveis por técnicas de coloração, porém incapazes de se dividir e formar colônias — o que as torna indetectáveis por métodos baseados em cultivo, além de outras subpopulações com atividades metabólicas heterogêneas.

Segundo Kwolek-Mirek e Zadrag-Tecza (2014), viabilidade é entendida como a proporção de células vivas capazes de reproduzir-se em meios sólidos ou líquidos, estando relacionada à integridade da membrana e à contagem de células vivas e mortas. Vitalidade, por sua vez, refere-se à capacidade funcional e fisiológica das células, isto é, às alterações intracelulares ou metabólicas que podem comprometer a divisão celular sem necessariamente causar morte. Em muitos cenários, efeitos tóxicos reduzem primeiro a vitalidade antes de culminarem na perda da viabilidade, o que ressalta a importância de distinguir esses parâmetros para interpretar corretamente os resultados experimentais.

Compreender como viabilidade e vitalidade se manifestam sob diferentes estresses é crucial em contextos industriais. A queda na capacidade reprodutiva e na sobrevivência observada ao longo de um bioprocessamento costuma refletir em fatores que afetam negativamente ambos os atributos. Por isso, para avaliar adequadamente como um microrganismo expressa suas características, torna-se necessário também quantificar sua longevidade reprodutiva e padrões de replicação no sistema estudado. As Tabelas 2 e 3 resumem os principais métodos empregados para análise de viabilidade e vitalidade em leveduras.

**Tabela 2.** Principais métodos utilizados em processos fermentativos para determinação de viabilidade celular<sup>1</sup>.

Método	Breve descrição
Contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C)	Este teste conta o número de colônias que crescem em um meio de cultura após a incubação de uma amostra de células. Cada colônia surge de uma única célula viável.
<i>Spotting Test</i>	Diferentes diluições de uma cultura de células são depositadas sobre o meio em uma placa de Petri. Ele permite a observação visual da capacidade das células de crescer em condições específicas.
Zona de Inibição de Crescimento	Esse teste avalia a capacidade das células de crescer em torno de um disco impregnado com uma substância inibitória, como um antibiótico. A presença ou ausência de crescimento indica a sensibilidade ou resistência das células ao composto testado.
<i>Temporal-Lapse Photomicroscopy</i>	Este método utiliza microscopia para observar células ao longo do tempo em presença de um corante vital, como a floxina-B. Ele permite a diferenciação entre células vivas e mortas com base na capacidade de reprodução e na integridade celular.
Iodeto de Propídio/Fluoresceína	Esses corantes são usados para avaliar a integridade da membrana celular. O iodeto de propídio penetra em células mortas ou danificadas, enquanto a fluoresceína marca células metabolicamente ativas.
Azul de Metileno/Eritrosina	Estes corantes são empregados para identificar células mortas, que são coradas de azul/rosa, enquanto células vivas permanecem incolores.

<sup>1</sup>Baseado em Eigenfeld *et al.* (2023); Kwolek-Mirek; Zadrag-Tecza (2014); Stewart (2017).

**Tabela 3.** Principais métodos utilizados em processos fermentativos para determinação de vitalidade celular<sup>1</sup>.

Método	Breve descrição
Atividade Metabólica	Este teste avalia a capacidade das células de realizar reações metabólicas, como produção de energia e síntese de biomoléculas.
Atividade Enzimática	Avalia a atividade de enzimas específicas dentro das células, o que pode ser indicativo do estado metabólico e da vitalidade celular.
Cultura em Meio Líquido	Neste teste, as células são incubadas em um meio de cultura líquido e o crescimento é monitorado ao longo do tempo por meio de medições de densidade óptica ou contagem de células.
Conteúdo de ATP	O ATP é uma molécula energética fundamental para as células. A medição do conteúdo de ATP pode indicar a capacidade das células de produzir e utilizar energia.
Potencial da Membrana Mitocondrial	Este teste avalia a integridade e o funcionamento das mitocôndrias, que são organelas responsáveis pela produção de energia na célula. Um potencial de membrana mitocondrial saudável é essencial para a função celular adequada.

<sup>1</sup>Baseado em Eigenfeld *et al.* (2023); Kwolek-Mirek; Zadrag-Tecza (2014); Stewart (2017).

Em *S. cerevisiae*, a vida reprodutiva replicativa (*replicative lifespan*) corresponde ao número de gerações que uma célula-mãe pode originar antes de cessar a divisão - tipicamente cerca de 25 gerações em estirpes selvagens, com máximos em torno de 40 gerações (Lesur; Campbell, 2004). Kamei *et al.* (2014) observaram que alterações metabólicas associadas ao envelhecimento surgem já a partir da 11<sup>a</sup> geração, incluindo maior atividade do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, redução na síntese de aminoácidos de cadeia ramificada e diminuição do glicogênio intracelular.

Após cada replicação, a célula-mãe forma um anel cicatricial de quitina e glucana na parede celular, intitulada de cicatriz de brotamento (Bacon *et al.*, 1966; Cabib *et al.*, 1997). Essas cicatrizes acumulam-se ao longo das divisões, e o número de brotamentos que uma célula realiza é condicionado por fatores genéticos, morfológicos, fisiológicos e ambientais (Eigenfeld; Kerpes; Becker, 2021). Brotos jovens não apresentam cicatrizes de brotamento; existem também as chamadas cicatrizes de nascimento (*birth scars*), que por não conterem

quitina, não são detectadas por corantes que marcam essa estrutura e não se correlacionam com o histórico reprodutivo da célula (Powell; Quain; Smart, 2003). Por isso, a contagem de cicatrizes de brotamento é um indicador prático do envelhecimento reprodutivo (*replicative age*) e ajuda a inferir sinais de senescência celular atuantes sobre a viabilidade e vitalidade em colônias.

Os métodos para avaliar viabilidade incluem técnicas de crescimento em meios sólidos e líquidos e ensaios com corantes. Técnicas de crescimento informam sobre células capazes de formar colônias, porém são lentas e não detectam células metabolicamente ativas incapazes de se dividir. Ensaios com corantes (colorimétricos ou fluorescentes) oferecem respostas rápidas e objetivas, discriminando células vivas e mortas com base na integridade da membrana ou no metabolismo celular (Eigenfeld *et al.*, 2023; Kwolek-Mirek; Zadrag-Tecza, 2014).

O azul de metileno é reduzido por células metabolicamente ativas, tornando-as incolores; células sem atividade enzimática permanecem coradas e são consideradas mortas (Lee; Robinson; Wang, 1981). Contudo, em processos com ciclos sucessivos — onde as células enfrentam estresses como alta concentração de açúcar, etanol e pH baixo — muitas células ficam fisiologicamente fragilizadas, apresentando coloração intermediária ou mais clara com azul de metileno e podem ser classificadas como “mortas”, embora se recuperem ao serem plaqueadas em meio rico (YPD), formando colônias. Essa limitação introduz subjetividade e possibilidade de falsos-positivos, dependentes do tempo de exposição ao corante (Feizi *et al.*, 2016).

A eritrosina é uma alternativa que tingem células mortas em rosa-avermelhado, oferecendo contraste mais nítido, menor exigência de reagentes e menor tendência a classificar equivocadamente células fragilizadas; além disso, não provoca o esverdeamento observado com azul de metileno em meios com alta concentração de açúcar (Martínez *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 1996).

A avaliação da vitalidade foca nas capacidades funcionais das células e inclui métodos como mensuração de ATP intracelular, potencial de membrana mitocondrial, ensaios de atividade enzimática e o teste de poder de acidificação. Este último, amplamente empregado na indústria cervejeira, estima a atividade fermentativa por meio da redução do pH extracelular após a adição de glicose (Kwolek-Mirek; Zadrag-Tecza, 2014; Stewart, 2017).

O termo *viable but non culturable*, VBNC, refere-se a células que mantêm integridade estrutural e sinais de atividade metabólica, mas apresentam perda temporária da capacidade de formar colônias em placas (Liu *et al.*, 2023). Em termos fisiológicos, o estado VBNC constitui uma resposta ao estresse ambiental em que a célula reduz funções

proliferativas e reorienta o metabolismo para manutenção, muitas vezes de forma reversível após a remoção do estressor (Liu *et al.*, 2023).

Em leveduras, evidências de VBNC foram obtidas experimentalmente mediante exposição a agentes estressores, seguida de recuperação da capacidade de crescimento em condições favoráveis (Salma *et al.*, 2013). Na prática, a identificação de VBNC exige a combinação de ensaios de culturabilidade com métodos independentes de avaliação da viabilidade e da vitalidade celular, tais como contagem microscópica com corantes diferenciais, ensaios de ATP intracelular, testes de atividade enzimática, protocolos de reativação em meio rico, análise de padrões de velocidade de crescimento e citometria de fluxo (Pinto; Santos; Chambel, 2015). Assim, discrepâncias entre contagens por UFC e medidas de viabilidade microscópica podem indicar a presença de populações VBNC, cuja confirmação demanda ensaios complementares.

Por fim, tratamentos com ácido sulfúrico, comumente usados em processos industriais, têm sido associados à eliminação de células menos viáveis e à preservação de subpopulações mais robustas (Costa; Cerri; Ceccato-Antonini, 2018; Goldammer, 2022; Lorenzi, 2021). Entretanto, são necessários estudos adicionais para elucidar como esses tratamentos afetam de modo integrado viabilidade, vitalidade e desempenho fermentativo.

## 4 MATERIAIS E METODOS

A não ser quando especificado, os experimentos e análises foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) da UFSCar, CCA-Campus Araras.

### 4.1 Microrganismos

As cepas de *S. cerevisiae* (linhagens industriais PE-2 e CAT-1) foram obtidas do banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) da UFSCar, CCA-Campus Araras. As leveduras foram armazenadas em meio YPD (*Yeast extract, Peptone, Dextrose*), composto por 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona e 20 g/L de ágar, mantidas em *slants* a 4°C.

### 4.2 Fermentação em batelada com reciclo celular e tratamento ácido

Para a propagação das leveduras, duas alçadas foram inicialmente cultivadas em 125 mL de meio YPD contendo 4% de glicose em Erlenmeyer de 250 mL. As culturas foram incubadas a 30°C, com agitação constante a 200 rpm, durante 24 h. Após esse período, 100 µL da cultura inicial foram transferidos para 1 L de caldo de cana esterilizado com aproximadamente 13° Brix, dentro de Erlenmeyer de 2 L. A utilização dessa concentração específica justifica-se pela necessidade de fornecer um aporte energético adequado para a multiplicação celular, mantendo, simultaneamente, o meio em uma faixa de baixa pressão osmótica. A etapa de propagação ocorreu por 72 h sob as mesmas condições de temperatura, com agitação ocasional para facilitar a liberação de CO<sub>2</sub>. Concluído o processo, as células foram separadas por decantação, o vinho foi armazenado, e a biomassa foi ajustada para 4 g de massa úmida, correspondente a uma concentração de 1x10<sup>9</sup> a 2x10<sup>9</sup> células por mL, sendo posteriormente acondicionada em tubos Falcon de 50 mL.

Os experimentos fermentativos foram realizados em triplicata, seguindo a metodologia descrita por Raghavendran *et al.* (2017). Inicialmente foi montado o pé-de-cuba da seguinte maneira: cada tubo Falcon de 50 mL continha aproximadamente 4 g de levedura em massa úmida, 2 mL de vinho (advindo da propagação) e aproximadamente 6 mL de água destilada estéril. O teor alcoólico final do pé-de-cuba foi ajustado para 5% (v/v) com etanol absoluto com base no teor alcoólico do vinho coletado, subtraindo-se proporcionalmente o volume de água. Foram adicionados 9,25 mL de caldo de cana esterilizado (14,5 g/100 mL de açúcar redutor total) em três momentos distintos: nos tempos 0, 2 e 4 h. Os tubos foram mantidos a 30°C, agitados periodicamente e pesados antes e depois da adição do caldo a cada 2 h, ao longo de 10 h, para monitorar a liberação de CO<sub>2</sub>.

Após esse período, os tubos foram retirados da incubadora, mantidos em temperatura ambiente até o dia seguinte (20 h no total) e novamente pesados.

Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 2.000 x g, com os sobrenadantes (vinho) sendo armazenados a -20°C para posterior análise das variáveis teor alcoólico, açúcar redutor total e pH. Os tubos foram pesados somente com a massa celular úmida advinda da pós-fermentação e iniciou-se o tratamento ácido, consistindo na adição de 2 mL de vinho (advindo da propagação), 6 mL de água e solução de ácido sulfúrico 1 N até pH 2,5, monitorando-se por meio do pH-metro. O teor alcoólico final foi ajustado com etanol absoluto com base no teor alcoólico do vinho coletado, subtraindo-se proporcionalmente o volume de água. Os tubos foram mantidos por 2 h a 30°C. Para o experimento controle, não foi adicionada a solução de ácido sulfúrico. Os tubos foram então homogeneizados e um volume de 100 µL foi retirado para as análises de viabilidade celular (por plaqueamento e contagem de células ao microscópio), testes de crescimento em meio líquido e contagem de cicatrizes de brotamento, após centrifugação e lavagem com solução salina 0,85%.

Em seguida foi iniciada a alimentação com caldo conforme descrito anteriormente, e esse procedimento (ciclo fermentativo e tratamento celular) foi repetido por um total de 6 ciclos fermentativos e 6 ciclos de tratamento.

### **4.3 Análises de viabilidade e vitalidade celular**

#### **4.3.1 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)**

O procedimento para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizado a partir de amostras da biomassa celular, as quais foram diluídas em série utilizando solução salina contendo 0,85% de NaCl. As diluições foram plaqueadas em duplicata em meio YPD, utilizando o método de semeadura em superfície. As placas foram incubadas a 30°C por um período de 72 h. Após o término da incubação, o número de colônias formadas foi contado, e os resultados foram expressos como UFC/mL.

#### **4.3.2 Coloração com corante Eritrosina**

A solução estoque de eritrosina B foi preparada dissolvendo-se 0,1 g de eritrosina B em 100 mL de PBS 1x (pH 7,2), obtendo-se concentração de 0,1% (m/v); a solução foi acondicionada em frasco âmbar e conservada a 4 °C, protegida da luz. Para avaliação da viabilidade, as amostras de levedura foram homogeneizadas e, quando necessário, diluídas na proporção apropriada. Em tubos de ensaio, transferiu-se 1 mL da suspensão celular e adicionou-se 1 mL da solução estoque de eritrosina (razão 1:1, v/v); as misturas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente (Martins *et al.*, 2024). Após a incubação, procedeu-se à contagem em câmara de Neubauer sob microscópio óptico (objetiva 40x).;

durante a análise consideradas células viáveis aquelas não coradas e células inviáveis as que apresentaram coloração róseo-avermelhada, além de contabilizar células com brotos. Os resultados foram expressos em número de células vivas/mL, viabilidade (%) e brotamento (%), conforme descrito por Ceccato-Antonini (2021), seguindo as seguintes fórmulas:

- Viabilidade (%) =  $(n^{\circ} \text{ de células viáveis} / (n^{\circ} \text{ de células viáveis} + n^{\circ} \text{ de células não viáveis})) \times 100$ .
- Brotamento (%) =  $(n^{\circ} \text{ de células viáveis em brotamento} / \text{total de células viáveis}) \times 100$ .
- Células viáveis/mL =  $\Sigma \text{ número de células contadas em 5 quadrículos} \times 5 \times 10^4 \times \text{diluição}$ .

#### 4.3.3 Crescimento em meio líquido

As amostras de massa celular foram padronizadas para uma concentração inicial de  $1 \times 10^7$  células/mL em meio YPD líquido e constituíram o inóculo para o teste de crescimento em meio líquido.

Em condições assépticas, adicionou-se 180  $\mu\text{L}$  de meio YPD estéril e 20  $\mu\text{L}$  do inóculo a cada poço de uma microplaca esterilizada de 96 poços, modelo "Costar 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene". Como controle negativo, utilizou-se meio YPD sem adição de inóculo. Após a montagem, a microplaca foi incubada na leitora de microplacas Tecan Infinite® M200.a 30°C, com agitação, por um período de 24 h. A absorbância foi medida a 600 nm em intervalos de 15 minutos, gerando as curvas de crescimento da levedura após cada ciclo de tratamento, ao longo dos ciclos celulares. Foram analisadas as amostras retiradas do pé-de-cuba e dos ciclos fermentativos 1 e 6.

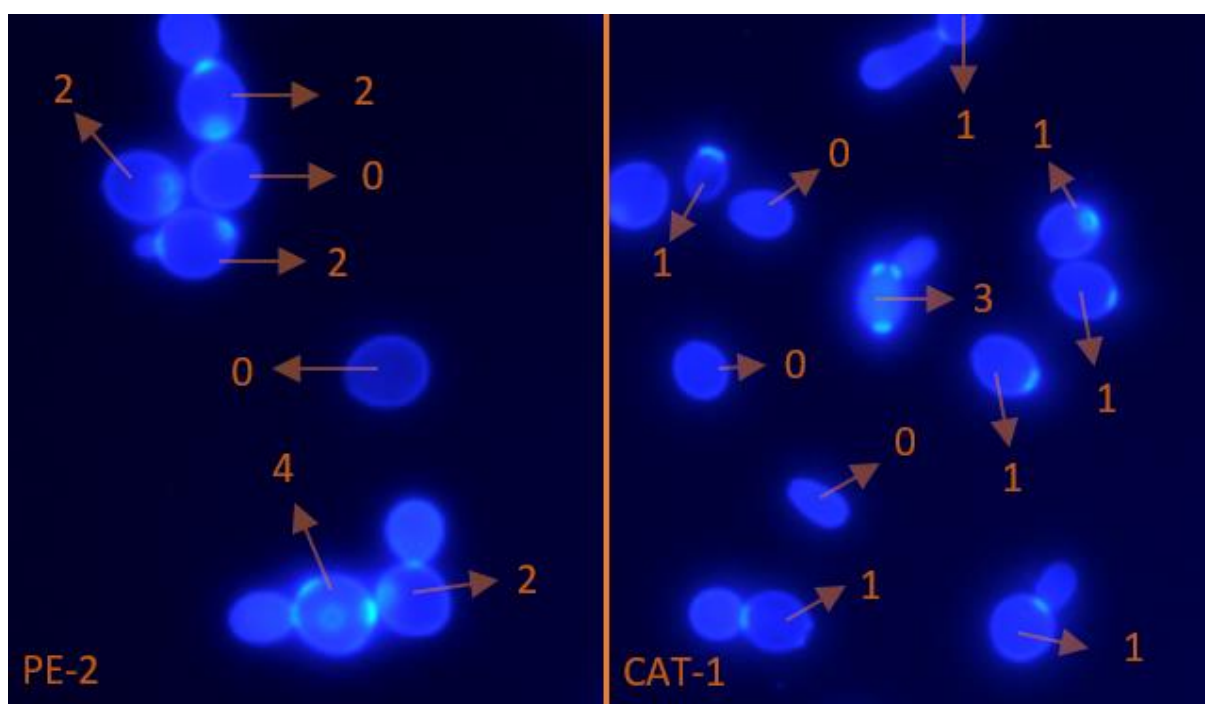
Os valores de absorbância foram transformados em  $\ln$  para análise dos dados. A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ,  $\text{h}^{-1}$ ) foi determinada pela regressão linear dos dados de  $\ln$  da absorbância em função do tempo durante a fase exponencial de crescimento, sendo o coeficiente angular da reta correspondente ao  $\mu_{\text{max}}$ . Foram também determinadas a duração da fase lag (h) e a variação da absorbância (absorbância ao final de 15 h – absorbância a 0 h) para cada amostra. O tempo de 15 h para avaliar a variação da absorbância foi estabelecido com base no menor período de tempo em que ocorreu a estabilização dos valores de absorbância.

#### 4.3.4 Contagem de cicatrizes de brotamento

Foi preparada uma solução de Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich®) a 10 mg/mL. Uma suspensão contendo 1 mL com  $10^6$  células/mL de levedura foi lavada com 150  $\mu$ L de sorbitol 1 M e ressuspensa em 150  $\mu$ L da solução corante, mantendo-se a suspensão a 4 °C por 5 min (Lesur; Campbell, 2004). Em seguida realizaram-se quatro lavagens sucessivas com sorbitol 1 M; as células foram então ressuspensas em 20  $\mu$ L da mesma solução e observadas em microscópio de fluorescência Leica Microsystems DM4000 B LED, utilizando o cubo de fluorescência A4 (faixa de excitação UV; filtros BP 340/40, RKP 400, BP 470/40). Os ajustes de aquisição utilizados foram: tempo de exposição = 432,6 ms; ganho (*gain*) = 1,2x; saturação = 1,00; gama = 0,70. Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Microscopia e Caracterização de Materiais (LabMiCam), UFSCar, CCA-Campus de Araras

Diferentes campos de avaliação ao microscópio foram fotografados (captura de imagens) e as imagens foram analisadas avaliando-se um número de 100 células de leveduras, contabilizando o número de cicatrizes de brotamento em cada uma das células (Figura 1). Os resultados foram analisados por meio da frequência do número de células em função do número de cicatrizes de brotamento (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 cicatrizes) no total de 100 células.

**Figura 1.** Visualização de células de *S. cerevisiae* das cepas industriais PE-2 (à esquerda) e CAT-1 (à direita), coradas com *Calcofluor White M2R*. O corante se liga à quitina, evidenciando as cicatrizes de brotamento (setas), que aparecem como regiões fluorescentes na parede celular. Os números indicam a quantidade de cicatrizes observadas por célula.



Fonte: Imagens do autor (2025).

#### 4.4 Análise da fermentação

Amostras dos sobrenadantes obtidos após cada ciclo fermentativo foram destiladas e o teor alcoólico foi determinado em densímetro digital Anton-Paar. O pH final foi determinado em pH-metro digital. A concentração de açúcar redutor total foi determinada após hidrólise das amostras com ácido clorídrico e quantificação pelo método do ácido-3,5-dinitrossalicílico (Miller, 1959).

O rendimento (g etanol produzido/g açúcar redutor total consumido) foi calculado seguindo a fórmula descrita em Raghavendran *et al.* (2017):

$$\text{RENDIMENTO DE ETANOL} = K \times \{(V_w + 0.7 \times P) \times ET - (2 + 0.7 \times P_p) \times ET_p\}$$

$$K = \frac{10,000}{64.75 \times V_s \times TRS}$$

onde:

$V_w$  = volume (mL) de vinho centrifugado;

$P$  = biomassa úmida de levedura peletizada (g);

$ET$  = etanol no vinho centrifugado (% v/v) ao final;

$P_p$  = biomassa de levedura peletizada do ciclo anterior (g);

$ET_p$  = título de etanol (% v/v) no vinho centrifugado do ciclo anterior (inóculo);

$V_s$  = volume do substrato (ml);

$TRS$  = açúcares redutores totais do substrato (g/100 ml).

#### 4.5 Análise estatística

Para todas as variáveis estudadas, foi calculada a média das triplicatas e o desvio-padrão, em cada ciclo fermentativo, para cada um dos tratamentos utilizados na fermentação (com ou sem ácido). Os resultados foram avaliados por Análise de Variância para dois fatores (*two-way anova*), considerando-se 'Ciclo' e 'Tratamento' como os fatores. Utilizou-se o *software Past (Palaeontological Statistics)*, versão 4.03 (Hammer; Harper; Ryan, 2001) para a análise estatística. Os resultados foram apresentados mostrando a significância ao nível de 5% para cada fator e variável estudada.

Para avaliar o efeito do tratamento (com e sem ácido) na frequência de células em relação ao número de cicatrizes de brotamentos, aplicou-se o teste de Qui-Quadrado para tabelas de contingência. O nível de significância utilizado foi de 5%. Com o intuito de verificar a diferença entre tratamentos, diversas hipóteses foram testadas, a saber: i) comparação entre tratamentos considerando a combinação entre leveduras e ciclos

fermentativos; ii) comparação entre tratamentos considerando a combinação apenas dos ciclos de fermentação (independente das leveduras); iii) comparação global, em que se considera conjuntamente todos os ciclos de fermentação e ambas as leveduras. A estatística de Qui-Quadrado foi calculada com  $i-1$  graus de liberdade, onde  $i$  representa o número de categorias não nulas para as cicatrizes de brotamento (total de oito categorias, variando de zero a sete). Todos os testes foram conduzidos no software *R*, utilizando a função `chisq.test`.

A relação 'número de cicatrizes de brotamento por número de células' foi calculada fazendo a somatória do número de cicatrizes multiplicado pelo número de células em cada categoria e dividindo pelo número total de células (número de 100). Os resultados foram avaliados por Análise de Variância para um fator (*one-way anova*), considerando-se 'Tratamento' como fator. Utilizou-se o software *Past (Palaeontological Statistics)*, versão 4.03 (Hammer; Harper; Ryan, 2001) para a análise estatística.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito do tratamento ácido sobre a levedura industrial PE-2

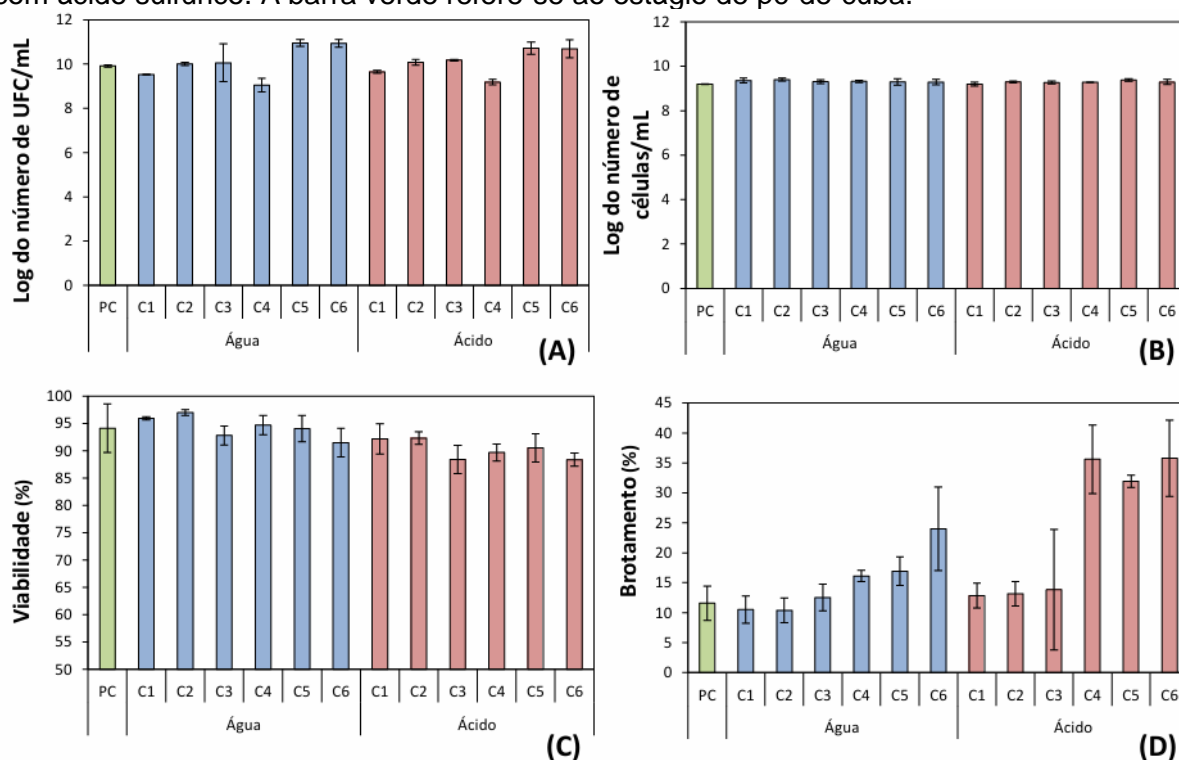
Os experimentos tiveram como objetivo investigar o efeito do tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,5; 2 h) sobre as linhagens industriais de *S. cerevisiae* PE-2 e CAT-1 durante fermentações em batelada alimentada com reciclo celular. Buscou-se avaliar, de forma isolada e combinada, os impactos dos reciclos e do tratamento ácido sobre parâmetros microbiológicos críticos, especialmente viabilidade e vitalidade celular. Além disso, o estudo teve como propósito identificar possíveis alterações no perfil fisiológico da população, incluindo a presença de células vivas, porém metabolicamente comprometidas, como aquelas incapazes de se dividir ou em estado de senescência. A hipótese central foi a de que a acidificação poderia modular a dinâmica de sobrevivência e atividade da levedura ao longo dos reciclos, resultando em mudanças no padrão de crescimento e na manutenção da eficiência fermentativa, efeitos que somente seriam evidenciados por uma análise integrada dos fatores principais e de suas interações.

No presente trabalho, foram considerados como indicadores de viabilidade: o número de UFC/mL (por plaqueamento em meio YPD), número de células viáveis/mL (por contagem em microscópio após coloração com eritrosina), e os percentuais de viabilidade e brotamento. Como indicadores de vitalidade, foram considerados os resultados de teor alcoólico/rendimento, parâmetros de crescimento em meio líquido (velocidade específica máxima de crescimento, duração de fase lag e variação de absorbância) e número de cicatrizes de brotamento.

Foi avaliada a culturabilidade (capacidade de formar colônia em meio sólido) das células por meio de crescimento em placas de Petri com YPD. No ensaio aqui empregado, ao final do sexto ciclo a linhagem PE-2 apresentou contagens médias de  $8,78 \times 10^{10}$  UFC/mL na fermentação sem tratamento ácido e  $4,92 \times 10^{10}$  UFC/mL na fermentação com tratamento ácido (Figura 2A), mas não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, houve efeito significativo dos ciclos sobre o número de UFC (Tabela 4). Houve queda até o quarto ciclo seguida de recuperação, terminando com valores superiores aos observados nos ciclos iniciais. O estresse fermentativo impõe pressão de seleção sobre a população de leveduras, favorecendo as subpopulações mais adaptadas ao bioprocessamento (Basso *et al.*, 2008). Em geral, a redução do número de UFC indica baixa adequação das células às condições operacionais, enquanto o aumento observado no presente experimento sugere que houve seleção de células capazes de se dividir e formar colônias ao longo dos reciclos.

Quanto ao número de células viáveis estimado por contagem em câmara de Neubauer após coloração com eritrosina, não foram detectadas diferenças significativas entre os ciclos, entre os tratamentos ou quanto à interação entre ambos (Figura 2B; Tabela 4). Importante destacar que, apesar da estabilidade da densidade celular, a contagem por UFC revelou um padrão distinto: a contagem em microscópio de células/mL manteve-se relativamente constante, porém apresentou valores ligeiramente inferiores às contagens de unidades formadoras de colônia. Essa discordância decorre das diferenças metodológicas: a contagem por UFC quantifica apenas as células capazes de proliferar em meio sólido — incluindo células em brotamento — enquanto a contagem microscópica com corantes avalia a integridade celular e a viabilidade imediata. Assim, algumas células podem manter integridade e atividade metabólica, mas exibir capacidade proliferativa reduzida em meio sólido em placa ou recuperar a habilidade de formar colônias apenas em meios ricos, o que explica a diferença entre as técnicas. Em conjunto, os resultados indicam que a população de PE-2 preservou uma proporção estável de células vivas ao longo dos ciclos, tanto no controle quanto sob tratamento ácido, evidenciando resiliência frente ao estresse fermentativo.

**Figura 2.** Log do número de UFC/mL, log do número de células/mL, viabilidade celular (%) e taxa de brotamento (%) da linhagem industrial CAT-1 ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba.



Quanto à viabilidade celular, no pé-de-cuba a viabilidade foi de 94,1%, sendo que ao final do sexto ciclo, os valores observados foram 91,4% na fermentação sem tratamento e 88,3% no tratamento com ácido sulfúrico. Houve diferença significativa entre os ciclos e os tratamentos, e em ambas as fermentações (com e sem tratamento ácido), a tendência foi de diminuição ao longo dos ciclos (Figura 2C; Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com ciclo celular (seis ciclos fermentativos) da linhagem industrial PE-2 em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).

Parâmetro	Two-way anova		
	Tratamento	Ciclo	Interação
Log número células/mL	n.s	n.s	n.s
Log número UFC/mL	n.s	*	n.s
Brotamento (%)	*	*	*
Viabilidade (%)	*	*	n.s
Teor alcoólico (g/100 mL)	n.s	*	n.s
Açúcar redutor total residual (g/100 mL)	n.s	*	*
pH final	*	*	*
Rendimento (g etanol/g açúcar redutor total)	n.s	n.s	n.s

n.s.= não significativo ( $p>0,05$ ); \*= significativo a 5% ( $p<0,05$ )

Pereira *et al.* (2011) relataram queda imediata da viabilidade por choque osmótico seguida de recuperação em aproximadamente 12 horas. Os autores ressaltam ainda que a morte de subpopulações sensíveis libera recursos que favorecem a proliferação de microrganismos mais resistentes, promovendo seleção e recuperação da culturabilidade. Os resultados com a linhagem PE-2 mostraram manutenção de elevada viabilidade até o sexto ciclo na fermentação sem tratamento ácido, sugerindo que, nas condições do protocolo empregado, a população foi capaz de recuperar sua atividade de forma eficaz, apesar das variações observadas ao longo dos ciclos.

Em relação ao brotamento, o percentual aumentou ao longo dos ciclos, sobretudo no tratamento sem ácido, passando de 11,56% no terceiro ciclo para 24,00% no sexto ciclo. No tratamento com ácido também houve aumento, finalizando com 35,79% no sexto ciclo (Figura 2D). A análise estatística indicou diferença significativa para ciclo, tratamento e interação significativa entre ciclo e tratamento (Tabela 4). Observou-se, portanto, aumento no número de células em brotamento durante a fermentação, com uma resposta mais acentuada nas condições submetidas ao tratamento com ácido sulfúrico. Esse

comportamento indica que a acidificação exerceu um estímulo sobre a atividade proliferativa das leveduras, resultando em índices de brotamento superiores quando comparados aos ensaios sem tratamento ácido.

Assim, os dados indicam uma seleção de subpopulações mais ativas à medida que os ciclos avançaram. Esse resultado, combinado com a análise de viabilidade, sugere que a linhagem PE-2 sofreu uma queda de viabilidade ao longo dos ciclos, enquanto a proporção de células capazes de brotar e formar colônias aumentou. Em contrapartida, apesar de redução na viabilidade percentual, principalmente quando empregado o tratamento ácido, verificou-se maior atividade reprodutiva conforme avançaram os ciclos, efeito que parece ter sido intensificado pela presença do ácido.

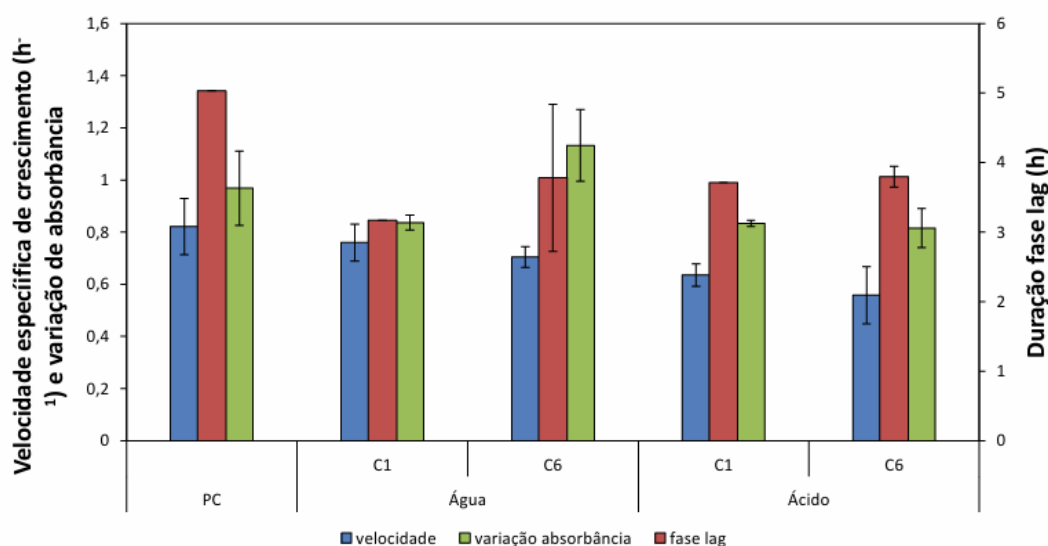
O perfil de crescimento em meio líquido foi monitorado em microplacas ao longo de 24 horas nas amostras de pé-de-cuba e ao final do primeiro e sexto ciclo de fermentação, permitindo avaliar parâmetros cinéticos fundamentais que caracterizam a dinâmica de crescimento celular: a velocidade específica máxima de crescimento, que indica a rapidez com que as células se dividem durante a fase exponencial; a duração da fase lag, representando o período de adaptação inicial antes do início da divisão ativa; e a variação da absorbância, refletindo as alterações na densidade celular ao longo do tempo.

Observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento apresentou diferença significativa em função do tratamento, havendo diminuição quando comparada à fermentação sem tratamento ácido. A variação de absorbância também mostrou diferença estatística, tanto para tratamento quanto para ciclo e para a interação entre ciclo e tratamento. Por outro lado, a duração da fase lag não apresentou diferença significativa para nenhum dos fatores analisados (Figura 3; Tabela 5). Os resultados da velocidade específica e absorbância são compatíveis com a atuação de uma forte pressão seletiva imposta pelo tratamento ácido e pelos reciclos: redução da fração sensível da população e um consequente aumento relativo da proporção de células em divisão (maior % de brotamento), ao mesmo tempo em que surgem indícios de comprometimento fisiológico (queda no  $\mu_{max}$ , redução da viabilidade e variações na culturabilidade).

Na Figura 4 são apresentados resultados de teor alcoólico, açúcares redutores totais residuais, pH final e rendimento. O teor alcoólico indica a eficiência da conversão dos açúcares em etanol, representando o produto final de maior interesse industrial. A concentração de açúcar redutor total residual, por sua vez, revela a capacidade da levedura em consumir o substrato disponível; valores mais baixos sugerem maior eficiência de utilização dos açúcares e, conseqüentemente, menor perda de matéria-prima. O pH final funciona como um parâmetro indireto tanto da atividade metabólica da levedura quanto da estabilidade do processo. Em cenários onde há o tratamento celular com ácido sulfúrico, esse valor também reflete como o tratamento contribui para a acidificação no processo,

fornecendo uma indicação importante do impacto dessa prática sobre o processo. Por fim, o rendimento (g etanol/g açúcar redutor total) é um indicador crítico, pois expressa a relação entre o etanol produzido e o substrato efetivamente consumido, permitindo avaliar se a cepa está direcionando seu metabolismo majoritariamente para a formação de etanol, desviando parte desse fluxo para outros compostos ou havendo perda deste açúcar para outros microrganismos. A análise conjunta desses resultados possibilita compreender não apenas a eficiência fermentativa, mas também a robustez da cepa frente às condições impostas.

**Figura 3.** Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ), variação de absorvância e duração da fase lag (h) da linhagem industrial PE-2 no estágio de pé-de-cuba (PC) e ao final dos ciclos 1 e 6 (C1 e C6) na fermentação em batelada alimentada.



**Tabela 5.** Resultado da análise estatística dos parâmetros analisados quanto ao crescimento em meio semissintético (YPD) das células da linhagem industrial PE-2 amostradas da fermentação em batelada alimentada com reciclo celular, após os ciclos fermentativos 1 e 6, em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).

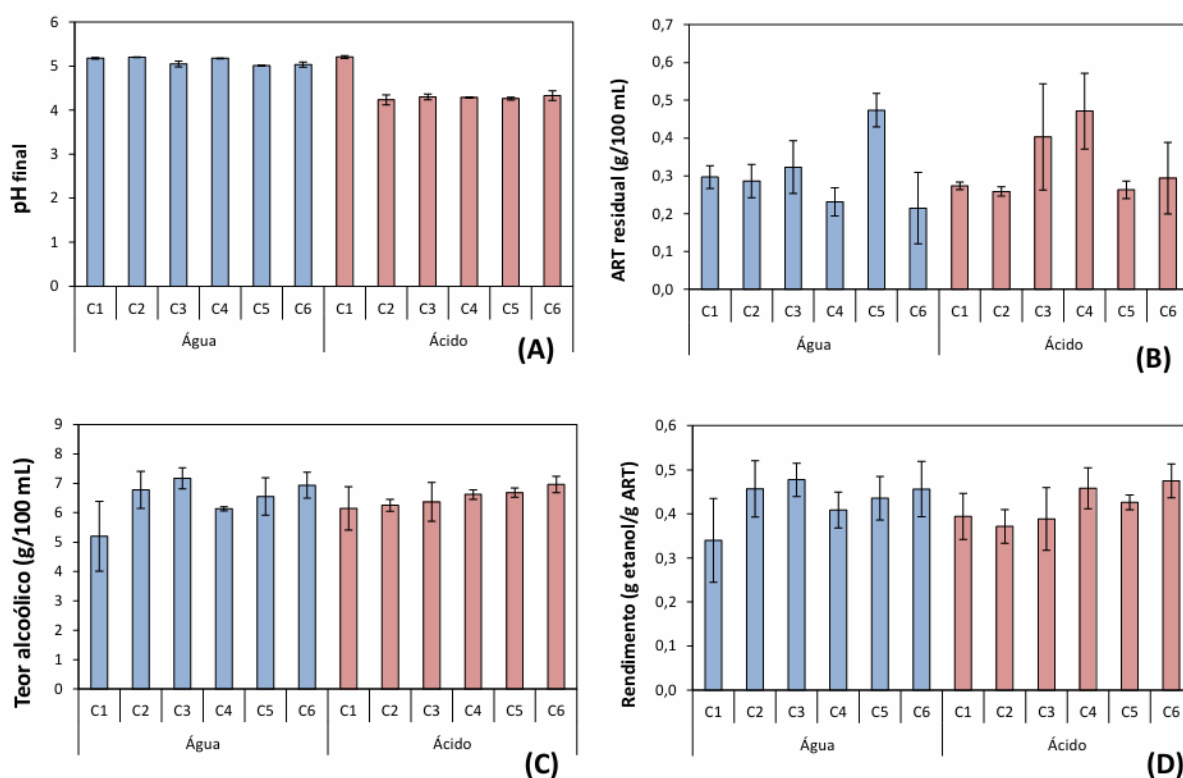
Parâmetro	Two-way anova		
	Tratamento	Ciclo	Interação
Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ )	*	n.s	n.s
Duração da fase lag (h)	n.s	n.s	n.s
Variação de absorvância	*	*	*

n.s.= não significativo ( $p>0,05$ ); \*= significativo a 5% ( $p<0,05$ )

Comparativamente, a fermentação com tratamento ácido exibiu redução de pH mais acentuada do que a fermentação sem tratamento ácido. A fermentação com tratamento

ácido apresentou uma queda de pH entre o primeiro e o segundo ciclo do que a fermentação controle, que exibiu variação moderada ao longo dos ciclos. No tratamento controle o pH médio iniciou em 5,10 no primeiro ciclo e finalizou em 5,03 no sexto ciclo. Na fermentação tratada com ácido sulfúrico o pH médio iniciou em 5,20 no primeiro ciclo e terminou em 4,30 no sexto ciclo (Figura 4A). Foram detectadas diferenças estatísticas significativas para os efeitos de tratamento, de ciclo e para a interação entre ciclo e tratamento (Tabela 4).

**Figura 4.** pH final, concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL), teor alcoólico (g/100 mL) e rendimento (g etanol/g ART) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com a linhagem industrial PE-2, lavada com água (barra azul) e com ácido sulfúrico (barra rosa).



Duas causas podem justificar essa redução: a produção de dióxido de carbono e a carga ácida introduzida pelo tratamento. A produção de dióxido de carbono durante a fermentação contribui para a queda de pH observada ao longo dos ciclos na fermentação sem tratamento ácido. O procedimento de tratamento celular do creme de leveduras até pH 2,5 e seu posterior processo de alimentação do mosto implicam a introdução de carga ácida residual no sistema; mesmo após diluição pela alimentação com caldo de cana, essa carga tende a reduzir o pH do processo fermentativo e a persistir nos ciclos seguintes, especialmente quando a capacidade tampão do mosto fermentativo é limitada.

A levedura *S. cerevisiae* apresenta crescimento adequado e eficiência fermentativa dentro de uma faixa de pH entre 4,0 e 6,0, sendo organismos acidofílicos que se desenvolvem melhor em condições levemente ácidas (Narendranath; Power, 2005). De acordo com Liu *et al.* (2015), essa levedura apresenta crescimento adequado e produção máxima de etanol em valores próximos de 4,9. Além disso, estudos de Lin *et al.* (2012) investigaram os efeitos de parâmetros como pH, temperatura e concentração de substrato na fermentação alcoólica utilizando a levedura *S. cerevisiae* BY4742, isolada da fermentação de vinho, demonstrando que pH abaixo de 3,0 pode causar severa inibição do crescimento, aumento da fase lag e redução da biomassa final. O pH inicial também influencia o consumo de açúcares e a produção de etanol, sendo que valores mais elevados (4,50–5,50) geralmente promovem maior rendimento etanólico e menor acúmulo de subprodutos, como glicerol e ácido acético.

Entretanto, nos dados obtidos a partir do crescimento em meio semissintético (YPD) observou-se que a duração da fase lag da cepa PE-2 não foi afetada pelo tratamento ácido, demonstrando a adaptação da cepa à acidificação do pH (Tabela 5).

Em relação ao teor de açúcar redutor total residual, observou-se que a condição sem tratamento ácido apresentou aumento no quinto ciclo, enquanto na condição com tratamento ácido o aumento ocorreu mais cedo. Foram detectadas diferenças estatisticamente significativas para ciclo e interação entre ciclo e tratamento, mas não houve diferença entre os tratamentos (Figura 4B; Tabela 4).

Em termos de produção de etanol, a fermentação com tratamento ácido mostrou valores iniciais superiores, com estabilização ao longo dos ciclos. Na fermentação sem tratamento ácido, as concentrações de etanol variaram ao longo dos ciclos, alcançando 6,94 g/100 mL no sexto ciclo. Na fermentação com tratamento ácido, o teor alcoólico atingiu a média de 6,97 g/100 mL no sexto ciclo. A análise estatística indicou efeitos significativos para ciclo, mas não para tratamento (Figura 4C; Tabela 4). Esses resultados sugerem adaptação da cepa PE-2 ao tratamento com ácido sulfúrico e estabilização da produção alcoólica após os ciclos iniciais.

Pereira *et al.* (2011) identificaram um limiar crítico em torno de 140 g/L de etanol, acima do qual a viabilidade de cepas industriais declina acentuadamente. Os teores alcoólicos máximos observados em nosso estudo foram de 6,94–6,97 g/100 mL, ou seja, 69,4–69,7 g/L, valores substancialmente inferiores a esse limiar. Dessa forma, embora tenha sido detectada diferença estatisticamente significativa para viabilidade (%) e para a contagem de UFC/mL em função de ciclo e de tratamento, é pouco provável que o teor de etanol isoladamente tenha provocado alterações críticas na população de *S. cerevisiae* PE-2 nas condições testadas.

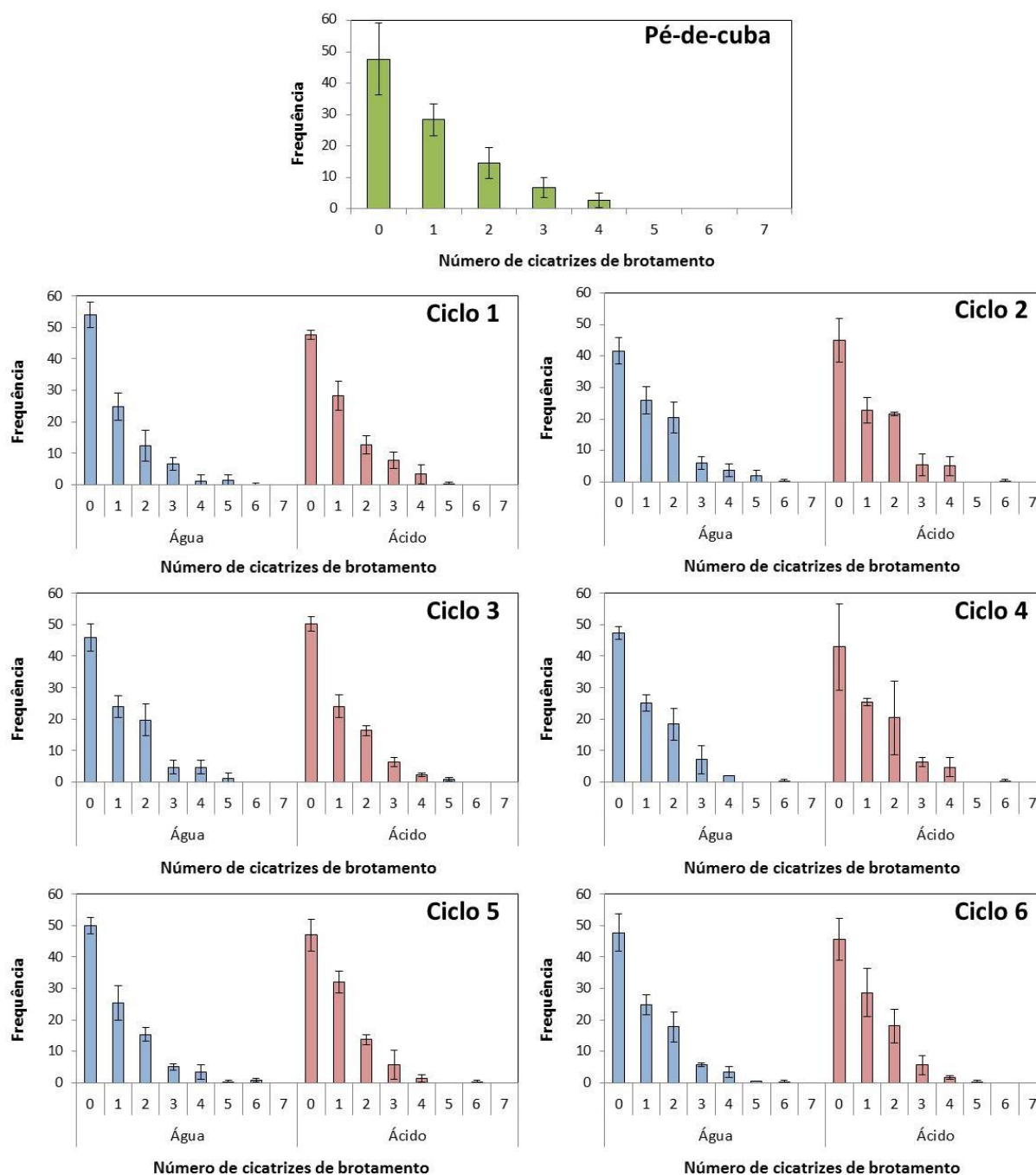
O rendimento em etanol, apesar das variações ao longo dos ciclos fermentativos, evoluiu para valores similares ao final do sexto ciclo, entre 0,45 e 0,47 g/g para fermentação sem tratamento ácido e com tratamento ácido, respectivamente. A análise estatística não identificou diferenças significativas entre ciclos, entre tratamentos e nem para a interação ciclo e tratamento (Tabela 4; Figura 4D). Embora tenham ocorrido variações significativas do teor alcoólico e da concentração de açúcares redutores totais ao longo dos ciclos fermentativos, o desempenho fermentativo da levedura não se alterou, mostrando que a linhagem industrial PE-2 é bem adaptada às condições do processo fermentativo, não sendo também impactada pelo tratamento ácido.

Os resultados da análise da frequência do número de cicatrizes de brotamento das células nas fermentações com e sem tratamento ácido estão apresentados na Figura 5. A análise estatística por Qui-quadrado mostrou não haver diferença nas frequências obtidas comparando-se os dois tratamentos (sem e com tratamento ácido) em cada ciclo fermentativo. O número de cicatrizes de brotamento é uma medida da idade da cultura de leveduras, o que indica o tempo de vida replicativa da levedura (Hagiwara *et al.*, 2011). O resultado aqui encontrado pode indicar que a idade das células nas condições sem e com tratamento ácido é praticamente a mesma, ou seja, a maioria das células tem entre 0 e 2 cicatrizes de brotamento independentemente do tratamento.

Hagiwara *et al.* (2011) discutiram a lei da conservação (*conservation law*) em leveduras que se reproduzem por brotamento (*budding yeasts*) em meio líquido, afirmando que “o tamanho da população (número total de células) é aproximadamente igual à soma total de cicatrizes de todas as células”. Depois de algumas horas de cultivo, o número de células originais se torna menor do que 0,05% do número total de células, sendo, portanto, insignificante. Assim, os autores consideram que, se muitas células ‘velhas’ morrerem na cultura, o número total de células se torna maior que o número de cicatrizes. Ao contrário, se muitas células filhas morrem, o número total de células fica menor que o número de cicatrizes. Eles estabelecem, portanto que, se a relação número médio de cicatrizes/número de células for 1, não há discrepância na lei da conservação; se for menor que 1 significa que células mais velhas morreram com mais frequência; e se for maior que 1, então são as células mais jovens que morreram.

Aplicando esse parâmetro aos resultados ‘número de cicatrizes – número de células’ para cada condição – sem tratamento e com tratamento ácido – observa-se que a média geral para a fermentação sem tratamento foi de 0,94 e para a fermentação com tratamento foi também 0,94, confirmando, portanto, que a lei da conservação se aplica à ambas as condições, ou seja, o tratamento ácido não tem influência sobre a vida replicativa da levedura.

**Figura 5.** Frequência de células em função do número de cicatrizes de brotamento da linhagem industrial PE-2 na fase de pé-de-cuba e após tratamento ácido (barra rosa) ou sem tratamento (barra azul) realizados após 6 ciclos na fermentação em batelada alimentada. Número total de células contadas=100.



Associando esse resultado aos dados obtidos para brotamento (%), parâmetro que apresentou diferença significativa entre os tratamentos (sendo maior para a condição tratamento ácido), pode-se inferir que há um estímulo ao brotamento das células devido à morte de células ocasionada pelo ácido, mas as células mortas são provavelmente células jovens, não havendo sobrevivência das células por muito tempo nas condições de

fermentação. Se isso acontecesse, o número de células com maior número de cicatrizes de brotamento seria maior.

## 5.2 Efeito do tratamento ácido sobre a levedura industrial CAT-1

Os mesmos experimentos foram realizados com a cepa CAT-1 para avaliar parâmetros de viabilidade e vitalidade a partir de indicadores microbiológicos e fermentativos. O propósito foi investigar como o tratamento com ácido sulfúrico influencia diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, permitindo discutir respostas adaptativas específicas de cada cepa e os mecanismos fisiológicos mobilizados durante a fermentação.

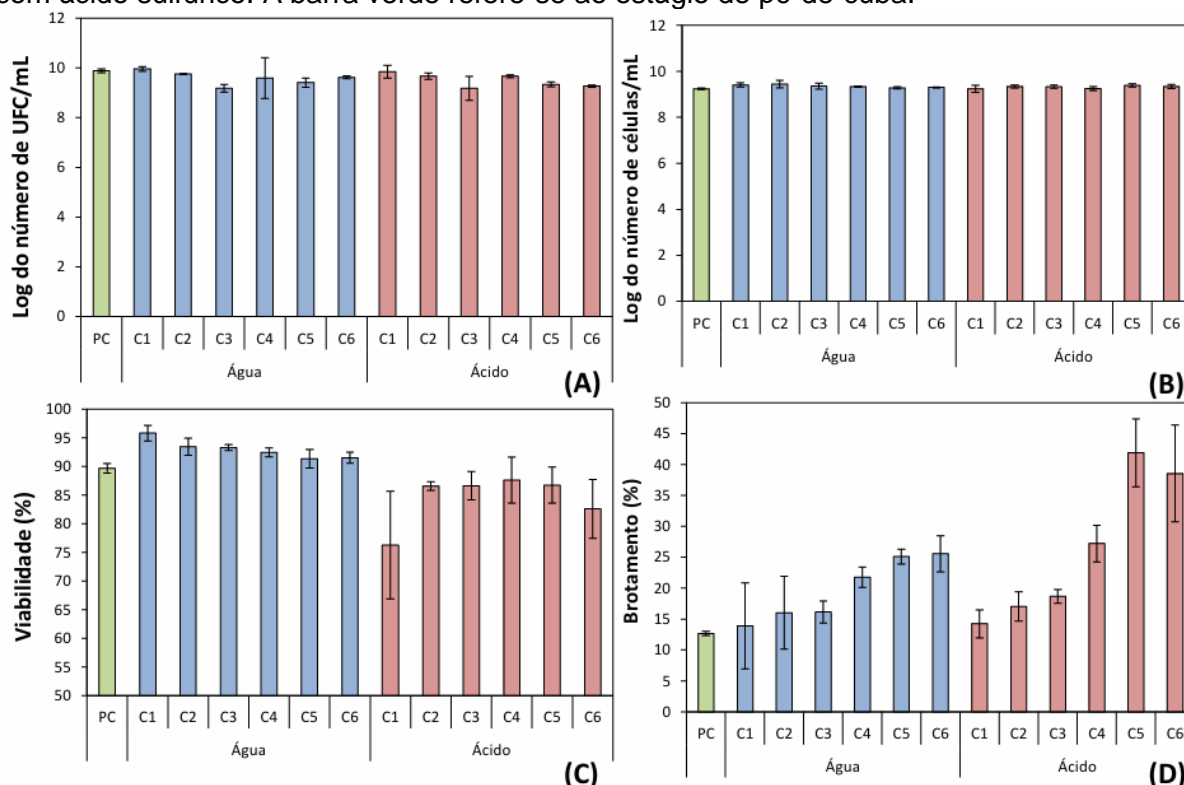
Quanto à contagem de UFC/mL, a linhagem CAT-1 apresentou valores médios de  $7,75 \times 10^9$  UFC/mL no pé de cuba. Ao final do 6.<sup>o</sup> ciclo fermentativo, observou-se uma redução para  $4,05 \times 10^9$  UFC/mL na fermentação sem tratamento ácido e  $1,76 \times 10^9$  UFC/mL na fermentação submetida ao tratamento ácido (Figura 6A). A análise estatística indicou diferença significativa entre os ciclos, mas não entre os tratamentos (Tabela 6), evidenciando que a cepa sofreu impacto ao longo dos ciclos fermentativos, reduzindo o número de UFC/mL. No entanto, o número de células viáveis/mL não apresentou variação significativa entre os ciclos ou entre os tratamentos (Figura 6B; Tabela 6).

Quanto à viabilidade celular (%), observou-se que na fermentação sem tratamento ácido, os valores iniciais foram de 89,7% no pé de cuba, atingindo 91,5% ao final do sexto ciclo. Na fermentação tratada com ácido sulfúrico, a viabilidade estabilizou-se em 82,6% no sexto ciclo. A análise estatística evidenciou diferença significativa entre os tratamentos, indicando uma redução geral da viabilidade na condição ácida em comparação à fermentação sem tratamento ácido (Figura 6C; Tabela 6). Esses resultados corroboram os achados de Della-Bianca e Gombert (2013), que destacaram a sensibilidade da linhagem industrial CAT-1 ao estresse provocado por baixos valores de pH, ressaltando que, em pH 2,5, a cepa CAT-1 não apresentou crescimento após seis dias de incubação. Os mesmos autores reforçam que a resposta da CAT-1 ao estresse ácido está associada não apenas à perda de crescimento, mas também a alterações fisiológicas que comprometem sua vitalidade. Em experimentos comparativos, CAT-1 apresentou maior redução de viabilidade do que PE-2 sob condições de 2,5, evidenciando menor capacidade de tolerância ao tratamento ácido (Della-Bianca; Gombert, 2013).

Em relação à atividade reprodutiva, a análise do percentual de brotamento revelou que a cepa CAT-1 apresentou valores médios significativamente superiores na presença do tratamento ácido, iniciando em 12,65% no pé de cuba e alcançando 38,52% no sexto ciclo fermentativo, em comparação com 25,55% na fermentação sem tratamento ácido (Figura 6D). Esses resultados indicam que o tratamento ácido estimulou a atividade celular associada ao brotamento, especialmente nos ciclos mais avançados. Além disso, a análise

estatística evidenciou diferenças significativas para os fatores ciclo, tratamento e para a interação entre ambos (Tabela 6). De forma geral, o processo fermentativo promoveu o aumento da divisão celular, sendo esse efeito potencializado pela aplicação do tratamento ácido.

**Figura 6.** Log do número de UFC/mL, log do número de células/mL, viabilidade celular (%) e taxa de brotamento (%) da linhagem industrial CAT-1 ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba.



O índice de brotamento (*budding index*, BI) quantifica a fração de células em divisão e funciona como um marcador direto da atividade reprodutiva da população. A medição em tempo real do BI permite detectar alterações na dinâmica celular que não são imediatamente evidentes por contagens totais ou CFU (Marbà-Ardébol *et al.*, 2018). Esses autores demonstraram que o BI se correlaciona fortemente com a taxa de crescimento e varia conforme as fases do cultivo; picos de BI ocorrem na adaptação/início do crescimento e declinam quando a população aumenta em quantidade de células em estágio reprodutivo. Assim, um aumento do BI em CAT-1 sob tratamento ácido pode indicar alteração da heterogeneidade populacional (seleção ou ativação de subpopulações reprodutivamente ativas) e/ou mudanças no estágio do ciclo celular que acompanham o estresse aplicado (Marbà-Ardébol *et al.*, 2018).

**Tabela 6.** Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (seis ciclos fermentativos) da levedura industrial CAT-1 em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).

Parâmetro	Two-way anova		
	Tratamento	Ciclo	Interação
Log número células/mL	n.s	n.s	n.s
Log número UFC/mL	n.s	*	n.s
Brotamento (%)	*	*	*
Viabilidade (%)	*	n.s	n.s
Teor alcoólico (g/100 mL)	*	*	*
Açúcar redutor total residual (g/100 mL)	*	*	*
pH final	*	*	*
Rendimento (g etanol/g açúcar redutor total)	*	*	n.s

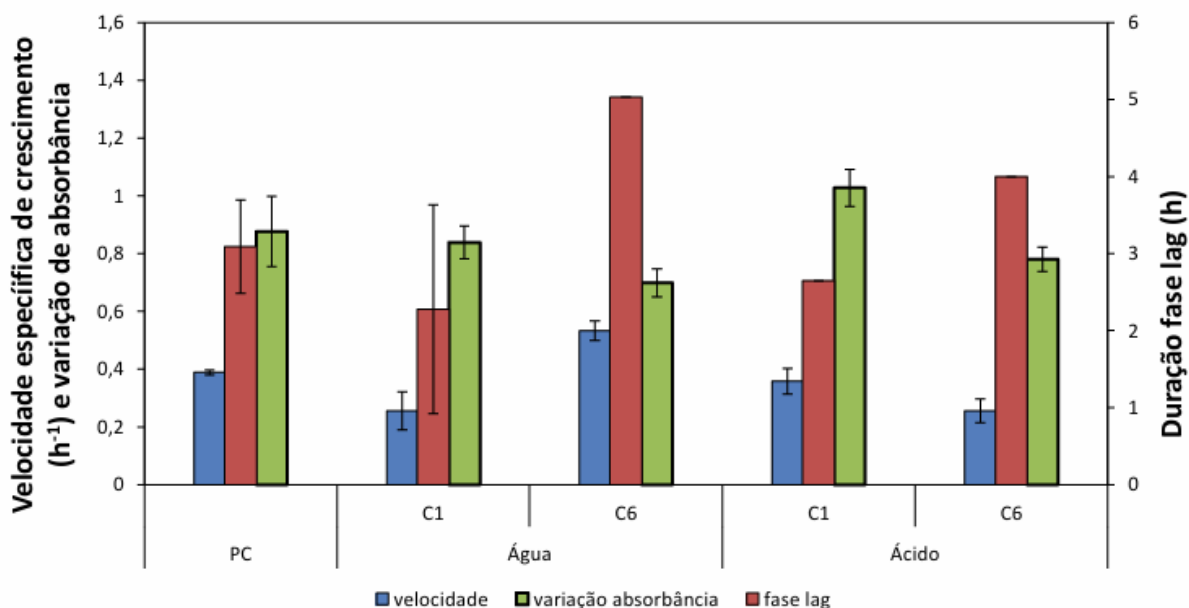
n.s.= não significativo ( $p > 0,05$ ); \*= significativo a 5% ( $p < 0,05$ )

Os parâmetros de crescimento da cepa CAT-1 em meio líquido estão apresentados na Figura 7, incluindo a velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ), a variação da absorbância e a duração da fase lag. A análise estatística revelou que a velocidade específica máxima de crescimento apresentou diferenças significativas para ciclo, tratamento e interação entre ciclo e tratamento (Tabela 7). Na fermentação sem tratamento ácido, a velocidade aumentou progressivamente do pé de cuba até o sexto ciclo. Em contraste, na presença do ácido, observou-se uma redução da velocidade de crescimento, resultando em valores inferiores aos observados no pé de cuba.

Especificamente quanto à duração da fase lag, houve diferença significativa entre ciclos, com redução média dos valores encontrados no pé-de-cuba para o primeiro ciclo fermentativo e aumento no sexto ciclo, tanto na fermentação sem quanto na fermentação com tratamento ácido. Já a variação da absorbância apresentou diferença significativa para ciclo e tratamento, demonstrando aumento no primeiro ciclo na presença do ácido e redução ao final do sexto ciclo em ambas as condições.

Em particular, a redução significativa da velocidade de crescimento na presença de ácido sugere que o tratamento induz mecanismos de adaptação ou tolerância que modulam o crescimento celular. Além disso, a interação significativa entre tratamento e ciclo observada na variação de absorbância indica que a resposta da cepa CAT-1 ao ácido, bem como seu comportamento de crescimento, varia ao longo dos ciclos fermentativos, refletindo ajustes fisiológicos frente ao estresse imposto pelo processo.

**Figura 7.** Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ), variação de absorbância e duração da fase lag (h) da linhagem industrial CAT-1 no estágio de pé-de-cuba (PC) e ao final dos ciclos 1 e 6 (C1 e C6) na fermentação em batelada alimentada.



**Tabela 7.** Resultado da análise estatística dos parâmetros analisados quanto ao crescimento em meio semissintético (YPD) das células da linhagem industrial CAT-1 amostradas da fermentação em batelada alimentada com reciclo celular, após os ciclos fermentativos 1 e 6, em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).

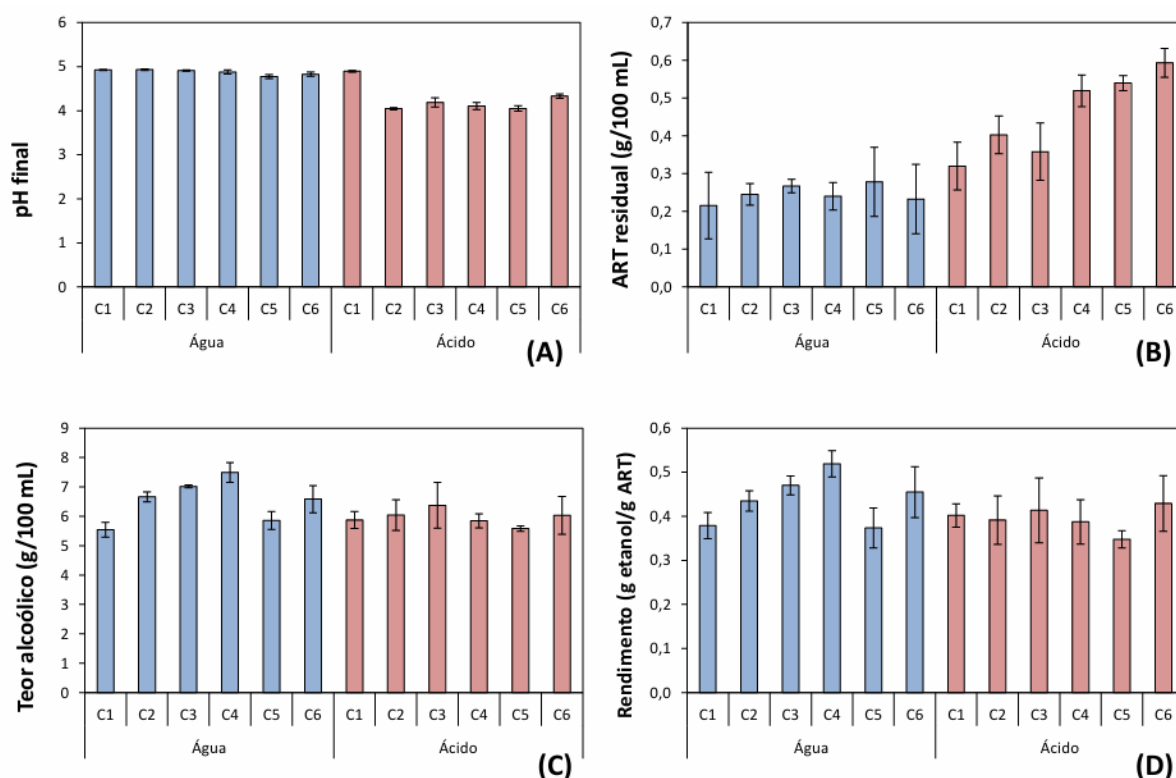
Parâmetro	Two-way anova		
	Tratamento	Ciclo	Interação
Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ )	*	*	*
Duração da fase lag (h)	n.s	*	n.s
Variação de absorbância	*	*	n.s

n.s.= não significativo ( $p>0,05$ ); \*= significativo a 5% ( $p<0,05$ )

Na Figura 8 são apresentados os resultados de teor alcoólico, açúcares redutores totais residuais, pH final e rendimento. Em relação ao pH (Figura 8A), foi observada diferença significativa entre ciclos e tratamentos, com interação significativa entre ciclo e tratamento (Tabela 6). A queda observada no pH final na fermentação com tratamento ácido era esperada, refletindo o efeito do procedimento de acidificação sobre o mosto. Assim como discutido para a linhagem PE-2, dois fatores principais explicam essa redução: a liberação de  $CO_2$  durante a fermentação, que ao reagir com a água forma ácido carbônico e reduz o pH à medida que os ciclos avançam; e o ajuste da solução de tratamento com ácido

sulfúrico para pH 2,5, seguido da alimentação com caldo de cana diretamente sobre essa solução, intensificando a queda de pH na fermentação com tratamento ácido.

**Figura 8.** pH final, concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL), teor alcoólico (g/100 mL) e rendimento (g etanol/g açúcar) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com a linhagem industrial CAT-1, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico.



Em relação aos açúcares redutores totais residuais (Figura 8B), observou-se aumento na quantidade de açúcares remanescentes até o terceiro ciclo, seguido de queda e posterior elevação até o sexto ciclo na fermentação sem tratamento ácido. Na fermentação tratada com ácido sulfúrico, verificou-se um aumento gradual dos açúcares residuais ao longo dos ciclos, alcançando uma média de 0,59 g/100 mL no sexto ciclo, em comparação com 0,23 g/100 mL na fermentação sem tratamento (Figura 8B). Foi detectada diferença estatisticamente significativa para ciclo, tratamento e interação entre ciclo e tratamento, indicando que a cepa CAT-1 apresenta redução na utilização do substrato à medida que a fermentação avança, especialmente sob efeito do tratamento ácido.

Segundo Della-Bianca e Gombert (2013), linhagens industriais como a CAT-1 apresentam queda de rendimento em condições de baixo pH. O estudo demonstra que, embora mantenha atividade fermentativa, há prejuízo no aproveitamento do substrato e no rendimento alcoólico, sobretudo em cenários que simulam o ambiente industrial de ciclos sucessivos.

O teor alcoólico (g/100 mL) apresentou comportamento distinto entre os tratamentos. Na fermentação sem tratamento ácido observou-se aumento do primeiro até o quarto ciclo, atingindo 7,49 g/100 mL; houve queda no quinto ciclo e o sexto finalizou em 6,58 g/100 mL. Na fermentação com tratamento ácido o pico ocorreu mais cedo, no terceiro ciclo, com 6,37 g/100 mL, valor inferior ao observado na fermentação sem tratamento ácido, e encerrou o sexto ciclo em 6,06 g/100 mL. A análise estatística indicou variação significativa em função de ciclo e de tratamento, além de interação entre ciclo e tratamento (Figura 8C; Tabela 6). Esses resultados sugerem que o tratamento com ácido sulfúrico afetou a capacidade da cepa CAT-1 de produzir etanol sob as condições testadas.

O rendimento em etanol, expresso em gramas de etanol por grama de açúcar redutor total (g etanol/g ART), apresentou comportamento distinto entre os tratamentos. Ao longo dos ciclos de fermentação, a condição sem tratamento mostrou melhor resultado nos ciclos intermediários, atingindo pico de 0,51 g/g no quarto ciclo e finalizando o sexto ciclo em 0,45 g/g. A fermentação tratada com ácido apresentou rendimento menor na fase final, com média de 0,42 g etanol/g no sexto ciclo. A análise estatística indicou diferença significativa em função de ciclo e de tratamento (Figura 8D; Tabela 6).

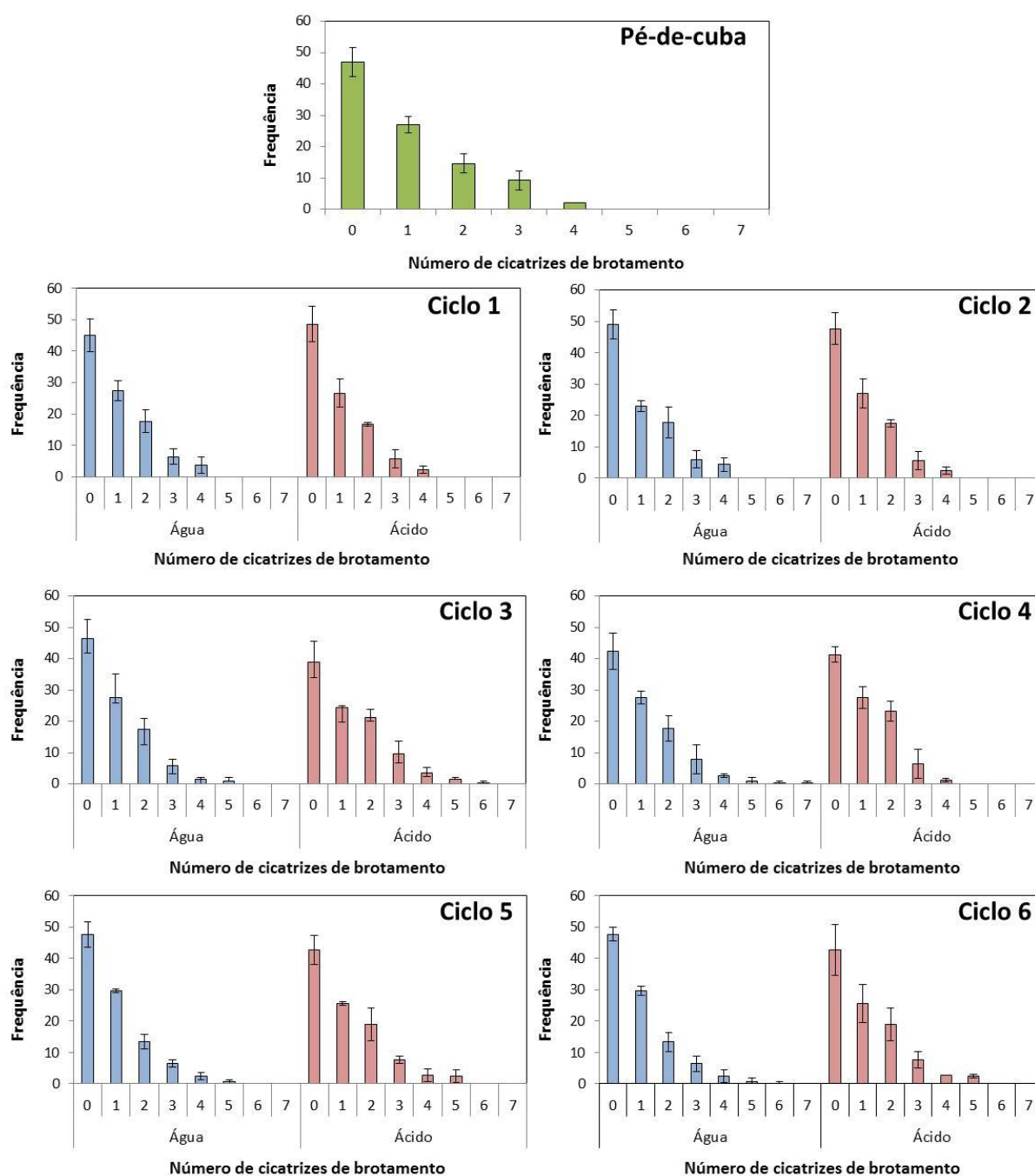
Os resultados da análise da frequência do número de cicatrizes de brotamento das células nas fermentações com e sem tratamento ácido estão apresentados na Figura 9. A análise estatística por Qui-quadrado mostrou não haver diferença nas frequências obtidas comparando-se os dois tratamentos (sem e com tratamento ácido) em cada ciclo fermentativo. O resultado aqui encontrado pode indicar que a idade das células nas condições sem e com tratamento ácido é praticamente a mesma, ou seja, a maioria das células tem entre 0 e 2 cicatrizes de brotamento independentemente do tratamento.

Aplicando o parâmetro proposto por Hagiwara *et al.* (2011), conforme descrito no item anterior para a linhagem PE-2, aos resultados 'número de cicatrizes – número de células' para cada condição – sem tratamento e com tratamento ácido – observa-se que a média geral para a fermentação sem tratamento foi de 0,96 e para a fermentação com tratamento foi 0,98, confirmando portanto que a lei da conservação se aplica à ambas as condições, ou seja, o tratamento ácido não tem influência sobre a vida replicativa da levedura.

Associando esse resultado aos dados obtidos para brotamento (%), parâmetro que apresentou diferença significativa entre os tratamentos (sendo maior para a condição tratamento ácido), a mesma explicação dada à linhagem PE-2 aplica-se à linhagem CAT-1, ou seja, pode-se inferir que há um estímulo ao brotamento das células devido à morte de células ocasionada pelo ácido, mas as células mortas são provavelmente células jovens, não havendo sobrevivência das células por muito tempo nas condições de fermentação. Se

isso acontecesse, o número de células com maior número de cicatrizes de brotamento seria maior.

**Figura 9.** Frequência de células em função do número de cicatrizes de brotamento da linhagem industrial CAT-1 na fase de pé-de-cuba e após tratamento ácido (barra rosa) ou sem tratamento (barra azul) realizados após 6 ciclos na fermentação em batelada alimentada. Número total de células contadas=100.



### 5.3 Análise comparativa do efeito do tratamento ácido sobre as linhagens industriais PE-2 e CAT-1

As linhagens industriais CAT-1 e PE-2 compartilham características favoráveis no ambiente fermentativo que propiciam sua ampla utilização no cenário brasileiro e internacional, dentre elas alta adaptabilidade, alto rendimento fermentativo e dominância perante demais cepas ao final de cada ciclo (Basso *et al.*, 2008).

Dessa forma, a comparação das análises deste estudo contribui para elucidar as diferenças presentes em ambas as cepas quanto aos efeitos causados sobre a vitalidade e a viabilidade celular na presença do tratamento com ácido sulfúrico.

Babrzadeh *et al.* (2012) analisaram a proximidade genômica entre as linhagens CAT-1 e JAY299, uma linhagem derivada haploide da linhagem PE-2, por meio da análise do número de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Os autores relataram que, ao analisar os genes *IRA1* e *IRA2*, verificaram diversas mutações que devem ter ocorrido durante a evolução dessas cepas. Embora tenham encontrado proximidade genética para o gene *IRA2*, não foi encontrada alta proximidade genética para o gene *IRA1* entre as linhagens. Ambos os genes foram associados à resposta ao estresse ambiental e possuem funções específicas em relação um ao outro.

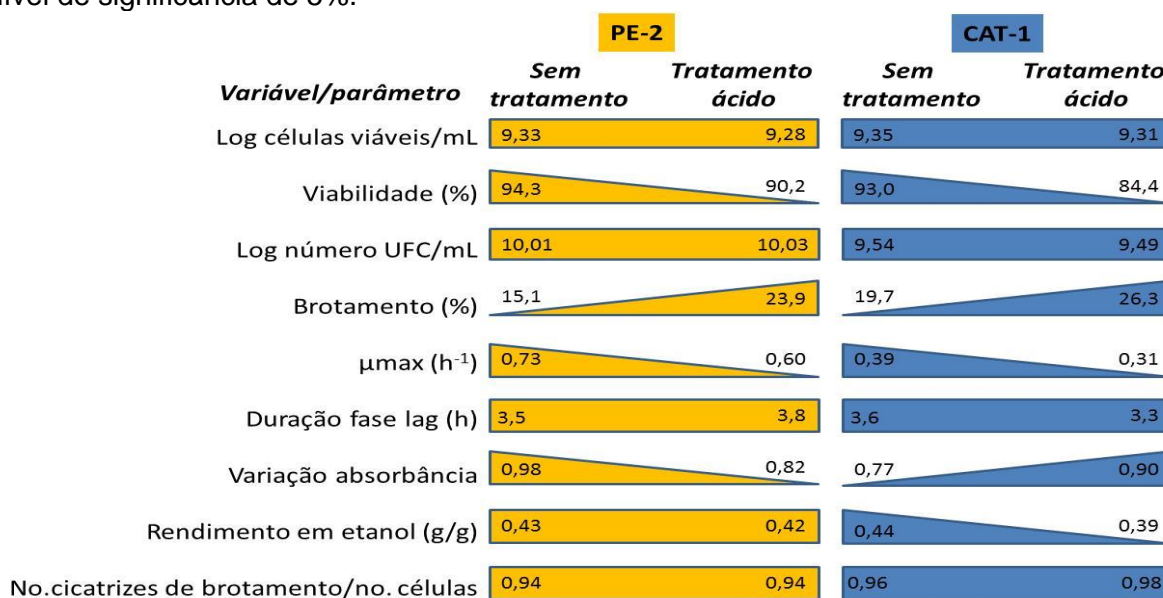
A Figura 10 traz uma representação na forma resumida de todos os resultados obtidos com as duas linhagens industriais de *S. cerevisiae*, evidenciando as médias gerais calculadas para as duas condições de tratamento (sem e com tratamento ácido) com os resultados das análises estatísticas.

Independentemente de apresentarem pontos de proximidade genética, as cepas manifestaram respostas distintas ao tratamento celular com ácido sulfúrico e aos ciclos celulares. Quanto à linhagem PE-2, esta apresentou variações significativas entre os ciclos fermentativos para diversos parâmetros/variáveis, como o número de UFC/mL, viabilidade, brotamento, teor alcoólico, pH final, açúcar redutor total residual e variação de absorvância no teste de crescimento em meio líquido (Tabela 4). Entre os tratamentos (com e sem ácido sulfúrico), observou-se diferença significativa para brotamento, viabilidade e variação de absorvância (Figura 10). Contudo, essa linhagem industrial não demonstrou alterações significativas no teor alcoólico e no consumo de açúcares redutores totais em relação ao tratamento com ácido sulfúrico, sugerindo que a sua atividade metabólica foi relativamente estável independentemente do uso do ácido sulfúrico no tratamento celular. O rendimento em etanol foi igual no sexto ciclo em ambas as fermentações, demonstrando que esta cepa se mostra adaptada ao tratamento (Figura 10).

Em comparação, a linhagem CAT-1 apresentou respostas mais pronunciadas aos ciclos fermentativos e aos tratamentos, com diferenças significativas para ciclo em parâmetros como o número de UFC/mL, brotamento, teor alcoólico, teor de açúcar redutor

total residual, pH, rendimento, velocidade específica de crescimento e variação de absorbância (Tabela 6). Já para tratamento, essa linhagem apresentou diferença estatística para brotamento, viabilidade, rendimento, velocidade específica de crescimento e variação da absorbância (Figura 10) sugerindo que a linhagem CAT-1 foi mais sensível aos fatores de estresse induzidos pelo tratamento ácido e potencializados pelo reciclo celular (Tabela 6). Essa maior sensibilidade pode estar relacionada às diferenças fenotípicas entre as linhagens industriais de *S. cerevisiae*, como evidenciado por Reis *et al.* (2017).

**Figura 10.** Representação resumida dos resultados obtidos neste estudo com as linhagens PE-2 e CAT-1 nas fermentações em batelada alimentada com reciclo celular com e sem tratamento ácido, em caldo de cana. Os retângulos indicam não haver diferença significativa entre as médias (considerando a média geral de todos os ciclos) enquanto os triângulos apontam diferença significativa entre as médias, separadamente para cada linhagem, ao nível de significância de 5%.



Brown *et al.* (2013) investigaram a resposta transcricional das cepas CAT-1 e PE-2 após o 2º ciclo fermentativo, identificando que a CAT-1 apresentou uma resposta transcricional mais intensa do que a PE-2 às mudanças ocorridas ao longo dos ciclos de fermentação. Esse padrão foi evidenciado pela maior indução de genes relacionados à produção de energia, glicólise, ciclo do ácido tricarbóxico, cadeia transportadora de elétrons, fermentação e respiração aeróbia. Além disso, observou-se uma repressão gênica mais pronunciada na síntese de proteínas e em múltiplos genes associados à resposta ao estresse ambiental no final da fermentação, refletindo os desafios enfrentados pelas células durante a lavagem ácida e o estresse osmótico no início de cada ciclo fermentativo.

Um aspecto relevante a ser considerado refere-se ao rendimento fermentativo e ao teor de açúcar redutor total residual ao final da fermentação de cada cepa. Em ambos os

casos, observou-se sobra de açúcar ao final de cada ciclo fermentativo, acompanhada de queda no rendimento durante os ciclos intermediários avaliados (entre o 3.<sup>o</sup> e o 4.<sup>o</sup> ciclo, em ambos os cenários). Nesse contexto, análises complementares de liberação de CO<sub>2</sub> e de quantificação de carboidratos intracelulares são ferramentas úteis para elucidar o destino do substrato consumido. A literatura aponta que o acúmulo de carboidratos de reserva, como glicogênio e trealose está fortemente associado à manutenção da viabilidade celular, ao passo que a liberação de CO<sub>2</sub> é um bom indicador da velocidade fermentativa e da adaptação da cepa às condições industriais. Entretanto, Raghavendran *et al.* (2017) destacam que taxas reduzidas de desprendimento de CO<sub>2</sub> não implicam necessariamente em menor capacidade fermentativa. Em muitos casos, parte do carbono do mosto é desviada para a biossíntese de carboidratos de reserva, que além de funcionarem como importantes fontes de energia conferem maior tolerância celular ao estresse. Assim, o perfil de desprendimento de CO<sub>2</sub> pode se apresentar atenuado sem que isso comprometa o desempenho fermentativo ou a adaptação da levedura ao ambiente industrial.

Essa observação está de acordo com Basso *et al.* (2015), que indicam que leveduras industriais, como a PE-2, tendem a acumular maiores quantidades de trealose e glicogênio em comparação com leveduras não industriais. Esse acúmulo de carboidratos de reserva é uma característica adaptativa importante para processos industriais contínuos, onde a capacidade de tolerância ao estresse é crucial para a manutenção da viabilidade celular e para a eficiência do processo fermentativo ao longo do tempo (Trevisol *et al.*, 2011).

Os estudos de Santos *et al.* (2017) fornecem uma perspectiva adicional. A linhagem CAT-1 destacou-se por apresentar níveis aumentados de proteínas do complexo de síntese de trealose, como Tps1, Tps2 e Tps3, tornando-a mais eficiente no acúmulo dessa molécula. Além disso, a CAT-1 exibiu níveis elevados de proteínas como Ssa1, Hsp104 e Hsp26, que estão associadas à proteção contra o estresse, à prevenção da agregação de proteínas e à promoção da longevidade celular. Entretanto, os autores relataram que tais genes, ao comparar as cepas industriais CAT-1 e PE-2, são mais abundantes em CAT-1 do que na cepa PE-2 após o 1<sup>o</sup> ciclo fermentativo.

Trealose e glicogênio são os principais carboidratos de reserva de *S. cerevisiae*, representando parcela significativa da matéria seca da levedura (Ferreira; Amorim; Basso, 1999). Como dito anteriormente, a cepa PE-2 acumula mais trealose e glicogênio que leveduras de panificação. Além disso, esses carboidratos de reserva influenciam na viabilidade da levedura, apresentando uma queda drástica da viabilidade quando os níveis de trealose estão abaixo de limites críticos, enquanto maiores níveis de trealose contribuem para a tolerância ao estresse durante os reciclos (Basso *et al.*, 2008). Na fisiologia da levedura, o glicogênio acumula-se mediante a presença de glicose no meio, enquanto a trealose acumula-se somente após a exaustão da glicose (Françóis; Walther; Parrou, 2011).

Entretanto, os dados de concentração de açúcar redutor residual e rendimento fermentativo demonstraram a presença de açúcar ao final de cada ciclo fermentativo (ao redor de 4 g/L), ressaltando que o meio fermentativo não estaria com escassez de carboidratos.

O glicogênio exerce efeito diminuto sobre a pressão osmótica interna da célula, resultando em vantagem em meios com deficiência nutricional, enquanto a trealose atua sobre a estabilidade da estrutura da bicamada lipídica da membrana celular e das proteínas, evitando a agregação de proteínas e mudanças químicas em moléculas orgânicas (Eleutherio *et al.*, 2015; Singer; Lindquist, 1998). Tais características fisiológicas acarretam impactos diretos na fisiologia e, conseqüentemente, causariam efeitos sobre a fermentação e a produção de etanol.

Na indústria brasileira de etanol, os valores usuais variam entre 7 e 12% (v/v) (Brexó; Sant'Ana, 2017). Nos experimentos conduzidos, os teores alcoólicos médios ao final de seis ciclos foram de 6,47 g/100 mL (8,19% v/v) na condição sem tratamento e 6,51 g/100 mL (8,24% v/v) com tratamento ácido para a linhagem PE-2. Já a linhagem CAT-1 apresentou médias de 6,53 g/100 mL (8,27% v/v, sem tratamento) e 5,96 g/100 mL (7,54% v/v, com tratamento ácido). Em termos práticos, o impacto do tratamento ácido foi mais evidente em CAT-1 do que em PE-2.

Quanto ao rendimento, a linhagem PE-2 apresentou médias de 0,43 g/g (sem tratamento) e 0,42 g/g (com tratamento), valores bastante próximos entre si. Por outro lado, para a linhagem CAT-1, os rendimentos foram de 0,44 g/g (sem tratamento) e 0,39 g/g (com tratamento), indicando redução mais expressiva sob a condição de tratamento ácido.

Os dados mostram que para a linhagem PE-2, os ciclos celulares implicaram perda parcial de células, indicada pela redução estatisticamente significativa da viabilidade percentual ao longo dos ciclos (Tabela 4). Contudo, a densidade de células viáveis/mL, estimada por contagem microscópica (log células/mL), manteve-se sem variação significativa. Concomitantemente, observou-se aumento do percentual de brotamento com o avanço dos ciclos, o que sugere que a ativação do processo de brotamento compensou em parte a perda de viabilidade, resultando em uma população cultivável relativamente estável. Em conseqüência, essa dinâmica não pareceu comprometer a capacidade fermentativa da levedura, que registrou elevação do teor alcoólico e do rendimento nos ciclos intermediários (ciclos dois e três), independentemente da aplicação do tratamento ácido.

Essas diferenças foram suportadas pela análise estatística, indicando efeito de ciclo e de tratamento sobre os parâmetros fermentativos e sugerem que a capacidade de conversão de substrato em etanol pela CAT-1 foi mais sensível ao tratamento ácido do que a observada para PE-2.

No que tange à dinâmica populacional, os dados mostram impacto relevante do tratamento sobre a culturabilidade e a vitalidade da CAT-1. As contagens de UFC/mL

diminuíram do pé de cuba de  $7,75 \times 10^9$  UFC/mL para  $4,05 \times 10^9$  UFC/mL no 6.º ciclo em controle e para  $1,76 \times 10^9$  UFC/mL na condição sem tratamento (Figura 7A), evidenciando perda progressiva de unidades formadoras de colônia, especialmente com o tratamento ácido. A contagem microscópica do número de células por mL, por sua vez, não variou significativamente, enquanto a viabilidade percentual foi consistentemente menor na condição com tratamento ácido (iniciando em 76,3% e estabilizando em 82,6% no ciclo 6 contra 89,7% para 91,5% na fermentação sem tratamento). O percentual de brotamento aumentou de forma mais pronunciada na presença do ácido (12,65% para 38,52%), indicando maior estímulo à divisão celular em subpopulações capazes de brotar, mesmo com redução da culturabilidade.

Em conjunto, o padrão de aumento do açúcar residual — notadamente maior na condição com tratamento ácido, alcançando 0,59 g/100 mL no ciclo 6 versus 0,23 g/100 mL sem tratamento — associado à queda do rendimento e à redução da velocidade específica máxima de crescimento sob efeito do ácido, sugere que parte do carbono não foi convertida em etanol. Possíveis explicações incluem redução da atividade fermentativa por dano fisiológico, desvio de carbono para síntese de carboidratos de reserva ou competição/efeitos de coestressores; todavia, a confirmação desses mecanismos exige medidas complementares, como quantificação de glicogênio e trealose, perfil de açúcares por HPLC e mensuração de ATP intracelular.

Os resultados das contagens de cicatrizes de brotamento com as duas linhagens mostraram que não houve diferença quanto à idade das células nas duas situações de tratamento celular (com e sem tratamento ácido) após os ciclos fermentativos, de forma que a hipótese normalmente apresentada de que o tratamento ácido mata as células senescentes mantendo a população mais jovem e, portanto, mais fisiologicamente ativa (Gomes *et al.*, 2016; Oliva-Neto *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2011), parece não ser suportada pelos resultados aqui apresentados. O padrão de frequência de células em função do número de cicatrizes de brotamento é o mesmo desde a fase de pé-de-cuba, não variando entre os ciclos e entre os tratamentos. Desde a fase de propagação das células, essas apresentaram poucas cicatrizes de brotamento (a maioria até 2-3 cicatrizes). Porém, foi significativa a queda de viabilidade com o tratamento ácido para ambas as linhagens ao mesmo tempo que o número de células viáveis não se alterou significativamente. Esse resultado mostra que ocorre morte de células por ação do ácido, induzindo o aumento significativo no percentual de brotamento para produção de novas células e mantendo assim o número total de células constante. Porém as células que morrem são células jovens, de forma que uma célula não vive por muito tempo no ambiente fermentativo. Essa é uma hipótese que merece ser comprovada com outras técnicas que permitam seguir o curso de vida das células individualmente.

## 6 CONCLUSÃO

O tratamento com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ , pH 2,5; 2 h) aplicado ao final de cada ciclo afetou tanto a viabilidade quanto a vitalidade de *Saccharomyces cerevisiae*, de maneira dependente da linhagem. Na linhagem PE-2, o tratamento induziu redução da viabilidade (%), aumento do brotamento (%), queda da velocidade específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ,  $h^{-1}$ ) e alteração da variação de absorvância, indicando impacto sobre a vitalidade e a viabilidade da população. Não obstante, a capacidade fermentativa da PE-2 foi preservada ao longo dos seis ciclos: não se verificou comprometimento significativo no teor alcoólico (g / 100 mL) nem no rendimento (g etanol / g açúcares), caracterizando um perfil de robustez funcional em que a redução parcial de marcadores celulares não se traduz em perda de eficiência de conversão.

Em contraste, a linhagem CAT-1 demonstrou maior sensibilidade ao tratamento ácido. Observou-se aumento do brotamento (%), acompanhado de redução do teor alcoólico (g / 100 mL), acúmulo de açúcares redutores residuais (g / 100 mL) e queda do rendimento (g etanol / g açúcares). Esses achados indicam que, sob estresse ácido, CAT-1 mobiliza estratégias de divisão e sobrevivência em detrimento da eficiência fermentativa, resultando em menor consumo de substrato e perda de rendimento.

A análise das cicatrizes de brotamento (número de cicatrizes / número de célula) forneceu evidências convergentes em ambas as cepas: houve indícios de seleção de subpopulações metabolicamente ativas concomitante à morte de células de maneira prévia ao acúmulo de características correlacionadas a senescência, sugerindo redução da longevidade da população sob ciclos sucessivos de estresse.

Dessa forma, o tratamento celular com ácido sulfúrico mantém-se como uma opção tecnicamente viável e amplamente empregada para o controle bacteriano no contexto industrial, sem evidências de comprometimento da vida reprodutiva das linhagens de *S. cerevisiae* avaliadas nas condições estudadas. A análise das cicatrizes de brotamento indicou que o tratamento ácido não afetou a longevidade da levedura, sendo um fator atrelado à própria fermentação. Embora tenham sido observados efeitos negativos pontuais sobre viabilidade e vitalidade, especialmente dependentes da linhagem, tais alterações não se refletiram necessariamente em perdas de desempenho fermentativo. Na linhagem PE-2, em particular, o rendimento e o teor alcoólico foram mantidos ao longo dos ciclos, evidenciando que a exposição ao ácido sulfúrico pode ser compatível com elevada eficiência de conversão. Esses resultados reforçam que o tratamento ácido, quando adequadamente conduzido, concilia controle microbiano com preservação da dinâmica populacional e do rendimento fermentativo, devendo sua aplicação considerar a resposta específica de cada linhagem industrial.

## 7 LITERATURA CITADA

- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. *In*: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, A. G. D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, p. 39-46, 2009.
- AMORIM, H. V.; GRYSCHER, M.; LOPES, M. L. The success and sustainability of the Brazilian sugarcane–fuel ethanol industry. *In*: EGGLESTON, G. (ed.) **Sustainability of the sugar and sugar ethanol industries**. Washington: American Chemical Society. v. 1058, p.73–82, 2010.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- BACON, J. S.; DAVIDSON, E. D.; JONES, D.; TAYLOR, I. F. The location of chitin in the yeast cell wall. **Biochemical journal**, v. 101, n. 2, p. 36C, 1966.
- BATISTOTE, M.; CARDOSO, A. C.; ERNANDES, J. R.; DOFFINGER, R. D. Desempenho de leveduras obtidas em indústria do Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de caldo de cana. **Revista Ciência e Natura**, v. 32, p. 83-95, 2010.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. *In*: SANTOS BERNARDES, M. A. (ed). **Biofuel production recent developments and prospects**. Croatia: Intech, p.85-100, 2011.
- BABRZADEH, F.; JALILI, ROXANA.; WANG, C.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S.; ROBINSON-MOSHER, A.; NYREN, P.; SHAFER, R. W.; L. C. BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. DAVIS, R. W.; RONAGHI, M.; B GHARIZADEH, B.; STAMBUK, B. U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287, p. 485-494, 2012.
- BAYROCK, D. P; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.
- BISCHOFF, K. M.; LIU, S.; LEATHERS, T. D.; WORTHINGTON, R. E.; RICH, J. O. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 117-122, 2009.

- BOUIX, M.; GHORBAL, S.; PICQUE, D.; PERRET, B.; SAULOU-BÉRION, C. A rapid method for the assessment of the vitality of microorganisms using flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 101, n. 7, p. 577-587, 2022.
- BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423-434, 2017.
- BROWN, N.A.; CASTRO, P.A.; FIGUEIREDO, B.C.P.; SAVOLD, M.; BUCKERIDGE, M.S.; LOPES, M.L.; PAULLILO, S.C.L.; BORGES, E.P.; AMORIM, H.V.; GOLDMAN, M.H.S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G.H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 277-290, 2013.
- BURTNER, C.; MURAKAMI, C. J.; KENNEDY, B. K.; KAEBERLEIN, M. A. A molecular mechanism of chronological aging in yeast. **Cell Cycle**, v. 8, n. 8, p. 1256-1270, 2009.
- CABIB, E.; DRGON, T.; DRGONOVA, J.; FORD, R. A.; KOLLAR, R. The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, n. 1, p. 200-204, 1997.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação etanólica**: fundamentos, avanços e perspectivas. 1. ed. São Carlos: EDUFSCar, 2021.
- COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 77-85, 2018.
- DELLA-BIANCA, B. E.; GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 1083-1095, 2013.
- DELLA-BIANCA, B. E.; HULSTER, E.; PRONK, J. T.; VAN-MARIS, A. J.; GOMBERT, A. K. Physiology of the fuel ethanol strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 at low pH indicates a context-dependent performance relevant for industrial applications. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 8, p. 1196-1205, 2014.
- EIGENFELD, M.; KERPE, R.; BECKER, T. Understanding the impact of industrial stress conditions on replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 2, p. 665490, 2021.
- EIGENFELD, M.; WITTMANN, L.; KERPE, R.; SCHAWAMINGER, S.; BECKER, T. Quantification methods of determining brewer's and pharmaceutical yeast cell viability: accuracy and impact of nanoparticles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 415, p. 3201-3213, 2023.

- ELEUTHERIO, E.; PANEK, A.; MESQUITA, J. F.; TREVISOL, E.; MAGALHÃES, R.  
Revisiting yeast trehalose metabolism. **Current Genetics**, v. 61, p. 263-274, 2015.
- FEIZI, A.; YIBO, Z.; ALON, G.; ALEX, G.; MICHELLE, L., RAYMOND, Y. L. C.; BRANDON B.; HAYDAR O.; WEI L.; MICHAEL W.; YICHEN W.; AYDOGAN, O. Rapid, portable and cost-effective yeast cell viability and concentration analysis using lensfree on-chip microscopy and machine learning. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 22, p. 4350-4358, 2016.
- FRANÇOIS, J. M.; WALTHER, T.; PARROU, J. L. Genetics and regulation of glycogen and trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: LIU, Z. L. (ed). **Microbial stress tolerance for biofuels: systems biology**. Berlin: Springer, 2011. p. 29-55.
- GABRIEL, P.; DIENSTBIER, M.; MATOULKOVÁ, D; KOSAR, K.; SIGLER, K.. Optimised acidification power test of yeast vitality and its use in brewing practice. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 3, p. 270-276, 2008.
- GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1989. 388 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 1990.
- GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International Sugar Journal**, v. 110, p. 175–181, 2008.
- GOMES, A. D.; PEREIRA, A. A.; MARINI, D. C.; ZUIM, N. R. B. Análise de acidez, cobre e graduação alcoólica de aguardentes. **FOCO: Caderno de Estudos e Pesquisas**, n. 11, p. 7-21, 2016.
- GOLDAMMER, T. **The brewer's handbook: a complete book to brewing beer**. Apex Publishers, 2022. Disponível em: <[https://www.beer-brewing.com/beer\\_brewing/beer\\_brewing\\_brewers\\_yeast/yeast\\_management.htm](https://www.beer-brewing.com/beer_brewing/beer_brewing_brewers_yeast/yeast_management.htm)> . Acesso em: 10 Fev 2024.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p.808- 810, 2007.
- GRAVES, T.; NARENDRANATH, N. V.; DAWSON, L.; POWER, R. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2006.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- KAMEI, Y.; TAMADA, Y.; NAKAYAMA, Y.; FUKUSAKI, E.; MUKAI, Y. Changes in transcription and metabolism during the early stage of replicative cellular senescence in budding yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 46, p. 32081-32093, 2014.

- KARA, B. V.; SIMPSON, W. J.; HAMMOND, J. R. M. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 94, n. 3, p. 153-158, 1988.
- KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 7, p. 1068-1079, 2014.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.; Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v.11, p. 641-649, 1981.
- LESUR, I; CAMPBELL, J. L. The transcriptome of prematurely aging yeast cells is similar to that of telomerase-deficient cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 3, p. 1297-1312, 2004.
- LIMA, U. A., BASSO L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. *In*: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, v. 3. Cap. 1, São Paulo: Editora Edgard. Blucher, p.1-40, 2001.
- LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. **Álcool carburante: uma estratégia brasileira**. Curitiba: Editora UFPR, p. 248, 2002.
- LIMA, J. M. **Leveduras não-Saccharomyces para produção de etanol em mostos de cana-de-açúcar: resistência ao estresse, potencial fermentativo e de crescimento em condições de reciclo celular e tratamento ácido**. 2024. Qualificação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados). Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2024.
- LIN, Y.; ZHANG, W.; LI, C.; SAKAKIBARA, K.; TANAKA, S.; KONG, H. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. **Biomass and bioenergy**, v. 47, p. 395-401, 2012.
- LIU, J.; YANG, L.; KJELLERUP, B. V.; XU, Z. Viable but nonculturable (VBNC) state, an underestimated and controversial microbial survival strategy. **Trends in Microbiology**, v. 31, n. 10, p. 1013-1023, 2023.
- LIU, X.; JIA, B.; SUN, X.; AI, J.; WANG, L.; WANG, C.; ZHAO, F.; ZHAN, J.; HUANG, W. Effect of initial pH on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 4, M800-M808, 2015.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. P.; CHERUBIN, R. A. GODOY, A; AMORIM-NETO, H. B. V. **Leveduras personalizadas® para a produção de etanol: seleção dirigida pelo processo**. Piracicaba: Fermentec, 2015. 42p.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; NETO, H. B. A.; AMORIM, H. V. Ethanol

- production in Brazil: a bridge between Science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 64-76, 2016.
- LORENZI, M. S. FermentecNews. 2021. Alternativa para o tratamento ácido do fermento. Disponível em: <<https://fermentecnews.com.br/page/7/>>. Acesso em: 03 Feb 2024.
- LUCENA, B. T. L.; SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L. S.; MOREIRA, A. P. B.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; MORAIS, M. A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 298–306, 2010.
- MARBÀ-ARDÉBOL, A. M.; EMMERICH, J.; MUTHIG, M.; NEUBAUER, P.; JUNNE, J. Real-time monitoring of the budding index in *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivations with in situ microscopy. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 73, 2018.
- MARTINS, C. T.; JACOBUS, A. P.; CONCEIÇÃO, R. J.; BARBIN, D. F.; BOLINI, H.; GOMBERT, A. K. Simultaneous enumeration of yeast and bacterial cells in the context of industrial bioprocesses. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 51, kuae029, 2024.
- MARTÍNEZ, J. L. A.; CÁRDENAS, G.; RUIZ, M.; GUSILS, C. Análisis comparativo de colorantes vitales en el estudio de la viabilidad de levaduras. **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán**, v. 93, n. 1, p. 39-42, 2016.
- MAGER, W. H.; SIDERIUS, M. N. insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 251-257, 2002.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MORAES, J. **Desenvolvimento e padronização do ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade de leveduras no contexto microcervejeiro**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2017.
- NARENDRANATH, N.V.; HYNWA, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W. M. Effects of lactobacilli on yeast- catalyzed ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.11, p.4158-4163, 1997.
- OLIVA-NETO, P.; DORTA, C.; CARVALHO, A. F. A.; LIMA, V. M. G; SILVA, D. F. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation – yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.) **Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments**. 1st ed. Badajoz, Formatex. v. 1, p. 371-379, 2013.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 1, p. 25-31, 1997.

- OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. 89p.
- PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características flocculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, MG, Brasil, 2010.
- PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V. E. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 32, p. 59-68, 2009.
- PEREIRA, F. B; GUIMARÃES, P. M.R.; TEIXEIRA, J. A; L, DOMINGUES. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 130-136, 2011.
- PINTO, D.; SANTOS, M. A.; CHAMBEL, L. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 61-76, 2015.
- RAGHAVENDRAN, V.; BASSO, T. P.; SILVA, J. B.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 7, p. 971-983, 2017.
- REIS, V. R.; ANTONANGELO, A. T. B. F.; BASSIA, A. P. G.; COLOMBIC, D.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. **brazilian journal of microbiology**, v. 48, n. 2, p. 268-274, 2017.
- REIS, V. R., BASSI, A. P. G.; SILVA, J. C . G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1121-1131, 2013.
- SALMA, M.; ROUSSEAU, S. GRAND, A. S.; DIVOL, B.; ALEXANDRE, H. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 8, n. 10, e77600, 2013.
- SANTOS, R. M.; NOGUEIRA, F. C. S.; BRASIL, A. A.; CARVALHO, P. C.; LEPREVOST, F. V.; DOMONT, G. B.; ELEUTHERIO, E. C. A. Quantitative proteomic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains CAT-1 and PE-2. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 114-121, 2017.
- SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. **Molecular Cell**, v. 1, n. 5, p. 639-648, 1998.

- SILVA, F. C.; CESAR, A. A.; DE-MORAIS, J.; VILELA, M.; MENDES, C. Diagnóstico hídrico em destilarias de álcool em São Paulo. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 1, n. 1, p. 93-117, 2011.
- SILVA-NETO, J. M.; COVRE, E. A.; ROSA, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Can ethanol partially or fully replace sulfuric acid in the acid wash step of bioethanol production to fight contamination by *Lactobacillus fermentum*?. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 2, p. 323-332, 2020.
- STEWART, G. G. Yeast viability and vitality. *In*: STEWART, G. G. **Brewing and distilling yeasts**. Cham: Springer, p. 147-165, 2017.
- TREVISOL, E. T. V.; PANEK, A. D.; MANNARINO, S. C.; ELEUTHERIO, E. C. A. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 697-704, 2011.
- WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 482–487, 1999.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Gabriel Scanavachi de Jesus, realizada em 06/10/2025.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini (UFSCar)

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos (UFSCar)

Prof. Dr. Marcelo Augusto de Souza Costa (UEMS)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

TRATAMENTO ÁCIDO NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA: EFEITO SOBRE A  
VIABILIDADE E VITALIDADE DE LINHAGENS INDUSTRIAIS DE *Saccharomyces*  
*cerevisiae*

GABRIEL SCANAVACHI DE JESUS

Araras  
2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**TRATAMENTO ÁCIDO NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA: EFEITO SOBRE A  
VIABILIDADE E VITALIDADE DE LINHAGENS INDUSTRIAIS DE *Saccharomyces  
cerevisiae***

**GABRIEL SCANAVACHI DE JESUS**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Produção  
Vegetal e Bioprocessos Associados  
como requisito parcial à obtenção do  
título de MESTRE EM PRODUÇÃO  
VEGETAL E BIOPROCESSOS  
ASSOCIADOS

Araras

2025

## AGRADECIMENTOS

Ao longo do mestrado, enfrentei inúmeros desafios que, acima de tudo, revelaram a força que somos capazes de carregar e a contínua possibilidade de crescimento e de esperança. A todos que me acompanharam nesta trajetória, deixo meus mais sinceros e profundos agradecimentos.

À minha família — ao meu pai, Carlos; à minha mãe, Luciene; e aos meus irmãos, Camila e Miguel — agradeço pelo amor, pela compreensão nas horas de ausência e pelas palavras que me sustentaram nos momentos em que precisei seguir em frente. Sem o apoio incondicional de vocês, esta conquista não teria sido possível.

À minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, expresso minha mais profunda gratidão pela orientação atenciosa, pela paciência e pelas críticas sempre construtivas. Obrigado por acreditar no projeto, por compartilhar seu conhecimento e por orientar com rigor científico e sensibilidade humana em todos os momentos. Você é uma inspiração para todos à sua volta.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Gazaffi, agradeço pela orientação nos testes estatísticos.

Aos companheiros de laboratório — Bianca, Bruna, Cecília, Neto, Judieldo e Julienny — manifesto minha sincera gratidão. A convivência com vocês tornou tudo mais leve e o trabalho mais prazeroso; agradeço pela ajuda prática, pelas discussões científicas e pelo companheirismo diário.

À CAPES (Demanda Social) e à FAI-UFSCar (Bolsa de extensão Diretoria CCA-UFSCar), agradeço pela concessão do apoio financeiro na forma de bolsas que tornou possível a realização deste projeto. Agradeço também à Coordenação e à Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados pelo auxílio recorrente, pela atenção administrativa e pelo suporte operacional em todas as etapas deste trabalho.

Aos amigos que compartilharam risos, conselhos e momentos durante estes anos de mestrado, meu muito obrigado. Vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui e para celebrar cada pequena vitória ao longo do caminho. A amizade de vocês enriqueceu esta jornada e me inspira a sempre buscar o meu melhor. Sempre foi por vocês, e sempre será.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
2.1 Objetivo geral .....	4
2.2 Objetivos específicos .....	4
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
3.1 O processo de fermentação alcoólica no Brasil .....	5
3.2 Fatores que influenciam a levedura na fermentação .....	6
3.3 Tratamento celular com ácido sulfúrico na fermentação .....	9
3.4 Viabilidade e vitalidade celular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
<b>4 MATERIAIS E METODOS.....</b>	<b>15</b>
4.1 Microrganismos.....	15
4.2 Fermentação em batelada com reciclo celular e tratamento ácido .....	15
4.3 Análises de viabilidade e vitalidade celular .....	16
4.3.1 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) .....	16
4.3.2 Coloração com corante Eritrosina .....	16
4.3.3 Crescimento em meio líquido.....	17
4.3.4 Contagem de cicatrizes de brotamento.....	18
4.4 Análise da fermentação.....	19
4.5 Análise estatística .....	19
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
5.1 Efeito do tratamento ácido sobre a levedura industrial PE-2.....	21
5.2 Efeito do tratamento ácido sobre a levedura industrial CAT-1 .....	30
5.3 Análise comparativa do efeito do tratamento ácido sobre as linhagens industriais PE-2 e CAT-1 .....	37
<b>6 CONCLUSAO.....</b>	<b>42</b>
<b>7 LITERATURA CITADA .....</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais fatores que afetam diretamente o processo de crescimento da levedura e sua capacidade fermentativa <sup>1</sup> . . . . .	6
<b>Tabela 2.</b> Principais métodos utilizados em processos fermentativos para determinação de viabilidade celular <sup>1</sup> . . . . .	11
<b>Tabela 3.</b> Principais métodos utilizados em processos fermentativos para determinação de vitalidade celular <sup>1</sup> . . . . .	12
<b>Tabela 4.</b> Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (seis ciclos fermentativos) da linhagem industrial PE-2 em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5). . . . .	23
<b>Tabela 5.</b> Resultado da análise estatística dos parâmetros analisados quanto ao crescimento em meio semissintético (YPD) das células da linhagem industrial PE-2 amostradas da fermentação em batelada alimentada com reciclo celular, após os ciclos fermentativos 1 e 6, em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5). . . . .	25
<b>Tabela 6.</b> Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (seis ciclos fermentativos) da levedura industrial CAT-1 em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5). . . . .	32
<b>Tabela 7.</b> Resultado da análise estatística dos parâmetros analisados quanto ao crescimento em meio semissintético (YPD) das células da linhagem industrial CAT-1 amostradas da fermentação em batelada alimentada com reciclo celular, após os ciclos fermentativos 1 e 6, em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5). . . . .	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Visualização de células de *S. cerevisiae* das cepas industriais PE-2 (à esquerda) e CAT-1 (à direita), coradas com *Calcofluor White M2R*. O corante se liga à quitina, evidenciando as cicatrizes de brotamento (setas), que aparecem como regiões fluorescentes na parede celular. Os números indicam a quantidade de cicatrizes observadas por célula. . . . . 18
- Figura 2.** Log do número de UFC/mL, log do número de células/mL, viabilidade celular (%) e percentual de brotamento (%) da linhagem industrial PE-2 ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba. . . . . 22
- Figura 3.** Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ), variação de absorbância e duração da fase lag (h) da linhagem industrial PE-2 no estágio de pé-de-cuba (PC) e ao final dos ciclos 1 e 6 (C1 e C6) na fermentação em batelada alimentada. . . . . 25
- Figura 4.** pH final, concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL), teor alcoólico (g/100 mL) e rendimento (g etanol/g ART) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com a linhagem industrial PE-2, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. . . . . 26
- Figura 5.** Frequência de células em função do número de cicatrizes de brotamento da linhagem industrial PE-2 na fase de pé-de-cuba e após tratamento ácido (barra rosa) ou sem tratamento (barra azul) realizados após 6 ciclos na fermentação em batelada alimentada. Número total de células contadas=100. . . . . 29
- Figura 6.** Log do número de UFC/mL, log do número de células/mL, viabilidade celular (%) e taxa de brotamento (%) da linhagem industrial CAT-1 ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba. . . . . 31
- Figura 7.** Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ), variação de absorbância e duração da fase lag (h) da linhagem industrial CAT-1 no estágio de pé-de-cuba (PC) e ao final dos ciclos 1 e 6 (C1 e C6) na fermentação em batelada alimentada. . . . . 33
- Figura 8.** pH final, concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL), teor alcoólico (g/100 mL) e rendimento (g etanol/g açúcar) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com a linhagem industrial CAT-1, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. . . . . 34
- Figura 9.** Frequência de células em função do número de cicatrizes de brotamento da linhagem industrial CAT-1 na fase de pé-de-cuba e após tratamento ácido (barra

rosa) ou sem tratamento (barra azul) realizados após 6 ciclos na fermentação em batelada alimentada. Número total de células contadas=100. . . . . 36

**Figura 10.** Representação resumida dos resultados obtidos com as linhagens PE-2 e CAT-1 nas fermentações em batelada alimentada com reciclo celular com e sem tratamento ácido, em caldo de cana. Os retângulos indicam não haver diferença significativa entre as médias (considerando a média geral de todos os ciclos) enquanto os triângulos apontam diferença significativa entre as médias, separadamente para cada linhagem, ao nível de significância de 5%. . . . . 38

# TRATAMENTO ÁCIDO NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA: EFEITO SOBRE A VIABILIDADE E VITALIDADE DE LINHAGENS INDUSTRIAIS DE *Saccharomyces cerevisiae*

**Autor: GABRIEL SCANAVACHI DE JESUS**

**Orientador: Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI**

## RESUMO

O controle de microrganismos contaminantes nas indústrias sucroalcooleiras brasileiras frequentemente envolve o uso do ácido sulfúrico, que aplicado ao final de cada ciclo fermentativo não só controla as bactérias contaminantes, mas também promove a desfloculação do fermento, contribuindo para a eficiência da produção de etanol. Há poucos estudos mostrando qual é o efeito do tratamento ácido sobre as leveduras agentes do processo fermentativo, especialmente quanto à viabilidade — entendida como a proporção de células vivas capazes de reprodução — e à vitalidade — definida como a capacidade funcional e fisiológica das células para desempenhar atividades metabólicas. Neste estudo, avaliou-se o efeito do tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,5; 2 h) sobre a viabilidade e a vitalidade de células de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando as linhagens industriais PE-2 e CAT-1 em fermentação em batelada alimentada com reciclo celular, em caldo de cana, durante seis ciclos fermentativos. Foram analisados número de UFC/mL, número de células viáveis/mL (coloração com eritrosina), viabilidade (%), brotamento (%), crescimento em meio líquido e contagem de cicatrizes de brotamento, bem como teor alcoólico (g/100 mL), pH final, açúcares redutores totais residuais (g/100 mL) e rendimento (g etanol/g açúcares redutores totais), após cada ciclo de tratamento das células. Foi também conduzida fermentação sem tratamento ácido, utilizando somente água no lugar do ácido. Na linhagem PE-2, o tratamento ácido afetou significativamente a viabilidade (%), brotamento (%), velocidade específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ,  $h^{-1}$ ) e variação da absorbância. Entretanto, o rendimento fermentativo não foi comprometido pelo tratamento ácido, sugerindo um perfil adaptativo capaz de sustentar a capacidade fermentativa; já a linhagem CAT-1 apresentou maior sensibilidade ao estresse ácido, de modo que a houve influência sobre o brotamento (%), o teor alcoólico (g/100 mL) e o consumo de açúcares (g/100 mL). O aumento do brotamento ocorreu concomitantemente ao acúmulo de açúcares residuais e à redução do rendimento, indicando a priorização da sobrevivência e da divisão celular em detrimento da eficiência fermentativa. Além disso, a análise das cicatrizes de brotamento revelou evidências de seleção de células metabolicamente ativas acompanhada da morte de células jovens, comportamento que não variou de forma expressiva entre as cepas e nem entre os tratamentos. Em conjunto, esses resultados permitem concluir que, embora a linhagem CAT-1 apresente persistência ao longo dos ciclos, exibe rendimento fermentativo inferior ao da PE-2 na presença do tratamento ácido, provavelmente devido à menor tolerância ao tratamento ácido, mobilizando de forma mais acentuada estratégias de crescimento para manter a viabilidade celular durante a fermentação.

**Palavras-chave:** Biocombustível; fermentação em batelada; vitalidade; viabilidade.

## **Acid treatment in ethanol fermentation: effect on the viability and vitality of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae***

**Author: GABRIEL SCANAVACHI DE JESUS**

**Adviser: Prof. Dr. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI**

### **ABSTRACT**

The control of contaminant microorganisms in Brazilian sugar-ethanol industries frequently involves the use of sulfuric acid, which, when applied at the end of each fermentation cycle, not only controls contaminant bacteria but also promotes deflocculation of the yeast, contributing to ethanol production efficiency. Few studies have investigated the effect of acid treatment on the yeasts responsible for the fermentative process, particularly regarding viability — understood as the proportion of living cells capable of reproduction — and vitality — defined as the functional and physiological capacity of cells to carry out metabolic activities. In this study, we evaluated the effect of sulfuric acid treatment (pH 2.5; 2 h) on the viability and vitality of *Saccharomyces cerevisiae* cells, using the industrial strains PE-2 and CAT-1 in fed-batch fermentation with cell recycling, in sugarcane broth, over six fermentation cycles. We analyzed CFU/mL, number of viable cells/mL (erythrosine staining), viability (%), budding (%), growth in liquid medium and counting of bud scars, as well as alcohol content (g/100 mL), final pH, residual total reducing sugars (g/100 mL) and yield (g ethanol/g total reducing sugars) after each cycle of cell treatment. A control fermentation without acid treatment was also conducted, using water in place of the acid. In the PE-2 strain, acid treatment significantly affected viability (%), budding (%), specific growth rate ( $\mu_{max}$ ,  $h^{-1}$ ) and change in absorbance. However, fermentative yield was not compromised by the acid treatment, suggesting an adaptive profile capable of sustaining fermentative capacity; in contrast, the CAT-1 strain showed greater sensitivity to acid stress, with effects on budding (%), alcohol content (g/100 mL) and sugar consumption (g/100 mL). The increase in budding occurred concomitantly with accumulation of residual sugars and reduction in yield, indicating a prioritization of survival and cell division at the expense of fermentative efficiency. Moreover, analysis of bud scars revealed evidence of selection for metabolically active cells accompanied by death of young cells, a behavior that did not vary markedly between strains or treatments. Taken together, these results indicate that, although the CAT-1 strain persists across cycles, it exhibits a lower fermentative yield than PE-2 in the presence of acid treatment, probably due to lower tolerance to the acid treatment and a stronger mobilization of growth strategies to maintain cell viability during fermentation.

**Key-words:** Biofuel; batch fermentation; vitality; viability.

## 1 INTRODUÇÃO

A vitalidade e a viabilidade celular são parâmetros centrais em qualquer bioprocessamento. A viabilidade diz respeito à capacidade do microrganismo de sobreviver, proliferar e estabelecer novas colônias, enquanto a vitalidade descreve o vigor fisiológico das células e sua aptidão para executar funções metabólicas essenciais. Embora distintos autores apresentem definições variadas para esses termos, tanto a viabilidade quanto a vitalidade exercem influência direta sobre a eficiência e a produtividade dos processos fermentativos, uma vez que o rendimento microbiano está intimamente ligado ao estado fisiológico da população celular.

No setor de bioprocessos, microrganismos como bactérias e leveduras são amplamente utilizados devido à capacidade de converterem matérias-primas renováveis em produtos de alto valor agregado, como ácidos orgânicos, enzimas, biomassa microbiana e biocombustíveis, incluindo o etanol. Em fermentações industriais, avaliar a viabilidade e vitalidade celular permite monitorar as populações microbianas e sua resistência a condições adversas, como variações de pH, temperatura e presença de compostos tóxicos. Essas análises fornecem informações importantes para ajustes que potencializem a eficiência dos processos.

Entre os diversos microrganismos utilizados, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* se destaca como principal agente fermentador na produção de etanol, devido à tolerância a estresses ambientais e à capacidade fermentativa. No Brasil, a produção de etanol desempenha um papel estratégico tanto no setor energético quanto no econômico, consolidando o país como um dos maiores produtores mundiais deste biocombustível. A maior parte do etanol brasileiro é produzido a partir da cana-de-açúcar, um recurso renovável amplamente cultivado em diversas regiões do país. Esse modelo de produção, baseado no conceito de biorrefinaria, permite o aproveitamento integral da biomassa da cana, resultando em produtos como o etanol hidratado e o anidro, utilizados como combustível veicular ou aditivo na gasolina.

Nas usinas brasileiras de etanol, um dos aspectos operacionais que contribui para a elevada produtividade dos bioprocessos fermentativos é o sistema de reciclo celular. Nesse método, após cada ciclo fermentativo, as células de levedura são recuperadas e reutilizadas em novos ciclos, garantindo um alto rendimento e reduzindo a necessidade de inoculação constante de novas culturas. Essa prática é vantajosa para manter a concentração celular elevada e favorecer a adaptação das células ao processo fermentativo, fator determinante para a eficiência da fermentação em larga escala. Entretanto, o reciclo celular apresenta um desafio significativo relacionado à contaminação microbiana. Ao longo dos ciclos, microrganismos indesejáveis podem se acumular e competir pelo substrato fermentável,

prejudicando o desempenho das células de *S. cerevisiae*. Além disso, o acúmulo de células senescentes, que possuem menor atividade metabólica, também pode afetar a eficiência global do processo.

Deste modo, embora o reciclo celular seja uma prática comum e vantajosa para aumentar a produtividade, ele também intensifica a necessidade de estratégias eficazes de controle microbiológico para mitigar contaminantes. Mesmo em condições controladas, o acúmulo de subprodutos tóxicos e o envelhecimento celular podem comprometer a viabilidade e vitalidade da comunidade de leveduras. Além disso, microrganismos indesejáveis agravam esse quadro ao competir pelo substrato e gerar metabólitos tóxicos, reduzindo ainda mais a eficiência fermentativa.

A contaminação microbiana configura-se como um significativo desafio à produção de etanol no Brasil, indo desde as etapas iniciais no campo até o processo de fermentação. Microrganismos contaminantes, como bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, comprometem a eficiência do processo ao competir com *S. cerevisiae* e produzir compostos que inibem a atividade fermentativa. Esse cenário, associado às condições não assépticas predominantes nas usinas, resulta em perdas significativas de produtividade e reforça a necessidade de práticas eficazes de controle microbiológico.

Entre as principais estratégias de controle utilizadas no setor sucroalcooleiro destacam-se o uso de antibióticos e o tratamento com ácido sulfúrico. Antibióticos como penicilina, tetraciclina e monensina inibem bactérias indesejáveis, permitindo que a fermentação ocorra de maneira mais eficiente. No entanto, seu uso enfrenta restrições devido às preocupações ambientais e ao risco de resistência microbiana em áreas próximas às indústrias. Isso tem motivado a busca por alternativas mais seguras e sustentáveis.

O tratamento com ácido sulfúrico, por sua vez, é amplamente utilizado ao final de cada ciclo fermentativo para reduzir as populações de bactérias contaminantes. Apesar de sua eficácia comprovada, a aplicação dessa técnica requer precauções quanto ao transporte, armazenamento e manuseio seguro do ácido, o que pode impactar a operacionalidade do processo. Além do controle microbiológico, o tratamento com ácido sulfúrico proporciona benefícios adicionais, como a desfloculação do fermento e possível remoção de células senescentes.

Embora sejam escassos os estudos experimentais que comprovem a eficácia do ácido sulfúrico na eliminação de células envelhecidas e frágeis, é possível que o dano celular relacionado à idade se acumule ao longo do tempo, comprometendo diversas atividades biológicas. Por esse motivo, é essencial investigar a relação entre esses fatores e validar os efeitos do tratamento com ácido sulfúrico durante a fermentação.

Em vista disso, o monitoramento do estado fisiológico das leveduras ao longo do processo fermentativo surge como uma estratégia promissora para garantir maior

estabilidade e produtividade na produção de etanol. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com ácido sulfúrico sobre a vitalidade e a viabilidade celular durante a fermentação etanólica em batelada alimentada com reciclo celular. Busca-se compreender de que forma esse tratamento pode influenciar o desempenho da levedura *S. cerevisiae*, contribuindo para a melhoria da eficiência fermentativa e a sustentabilidade do processo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com ácido sulfúrico sobre a viabilidade e vitalidade das linhagens industriais de *S. cerevisiae* (PE-2 e CAT-1) durante o processo fermentativo ao longo dos ciclos de tratamento.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar parâmetros/variáveis fermentativos das linhagens industriais de *S. cerevisiae* (teor alcoólico, açúcares redutores totais, pH e rendimento) ao final de cada ciclo fermentativo (total de 6), em fermentações com e sem tratamento com ácido sulfúrico, em caldo de cana;
- Avaliar a viabilidade celular e vitalidade por meio da quantificação do número de células viáveis por diluição seriada e plaqueamento, contagem direta de células após coloração com eritrosina, crescimento das células em meio líquido, número de cicatrizes de brotamento e percentuais de brotamento e viabilidade, ao final de cada ciclo fermentativo (total de 6), em fermentações com e sem tratamento com ácido sulfúrico, em caldo de cana;
- Comparar as linhagens industriais PE-2 e CAT-1 quanto aos efeitos do tratamento ácido sobre a viabilidade e vitalidade das linhagens.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 O processo de fermentação alcoólica no Brasil

A fermentação alcoólica é um processo biológico anaeróbio no qual açúcares simples, como glicose, frutose e sacarose, são metabolizados, resultando na produção de etanol e dióxido de carbono como produtos (Lima; Marcondes, 2002). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo predominante nesse processo industrial, em razão de sua eficiência na conversão de açúcares em etanol e de sua robustez frente às condições estressantes típicas da fermentação etanólica, como as altas concentrações de álcool, as variações de temperatura, o baixo pH e a pressão osmótica do meio (Ceccato-Antonini, 2021).

No Brasil, a eficiência fermentativa depende da qualidade do substrato, das condições do meio e da adaptação da levedura ao sistema operacional (Paschoalini; Alcarde, 2009). A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima, fornecendo caldo e melaço com alta concentração de sacarose; o melaço, por sua vez, é um subproduto do refino do açúcar e apresenta composição distinta do caldo, o que influencia a nutrição e o comportamento da levedura (Amorim; Basso; Lopes, 2009). Essas matérias-primas têm a vantagem de dispensar pré-tratamentos enzimáticos complexos, simplificando a operação industrial e reduzindo custos (Batistote *et al.*, 2010; Goldemberg, 2007).

O processo conhecido como *Méle-Boicot* é amplamente utilizado na indústria de etanol no Brasil e caracteriza-se pelo reciclo das células de levedura para os ciclos fermentativos subsequentes (Lopes *et al.*, 2016). O sistema de reciclo celular aliado ao modelo de condução do processo por batelada alimentada destacam-se como características marcantes da produção brasileira de etanol (Pacheco, 2010). O modelo de batelada alimentada confere maior flexibilidade operacional e permite ciclos fermentativos mais rápidos, uma vez que possibilita o controle rigoroso da concentração de açúcar no meio, minimizando efeitos inibitórios e maximizando a taxa de conversão. Isso se reflete em maior produtividade média quando comparado ao processo contínuo (Godoy *et al.*, 2008). Apesar disso, o sistema contínuo apresenta vantagens econômicas e de automação, com custos de implantação reportados como 50–60% inferiores aos do modelo em batelada alimentada (Ceccato-Antonini, 2021). Assim, a escolha do regime operacional resulta de um balanço entre custo, controle de processo e robustez operacional.

Em escala industrial, as dornas brasileiras costumam variar entre 0,5 e 3 milhões de litros. Durante a safra — aproximadamente 200–300 dias por ano — registram-se entre 400 e 600 ciclos fermentativos, com duração média de 6 a 12 horas cada. As concentrações celulares típicas são relatadas na faixa de 10–15% (m/v), e o vinho pós-fermentação

apresenta teor alcoólico final entre 7% e 11% (v/v), com glicose residual frequentemente inferior a 0,01% (Amorim; Basso; Lopes, 2009; Ceccato-Antonini, 2021).

Ao término de cada ciclo, as células são separadas do vinho por centrifugação e submetidas a procedimentos de tratamento com ácido sulfúrico antes de seu retorno à dorna para o próximo ciclo; o vinho segue para destilação e processamento subsequente (Lopes *et al.*, 2016).

### 3.2 Fatores que influenciam a levedura na fermentação

As condições operacionais do processo fermentativo impõem múltiplos desafios às leveduras, afetando tanto sua capacidade de fermentar quanto seu crescimento (Ceccato-Antonini, 2021). Entre os fatores determinantes destacam-se: pH baixo, variações de temperatura nas dornas, alta pressão osmótica, elevadas concentrações de etanol, composição do mosto e presença de contaminantes em níveis relevantes; tais efeitos são frequentemente intensificados pelo reciclo celular e por eventuais tratamentos do fermento (Basso; Basso; Rocha, 2011). A Tabela 1 sintetiza os principais fatores e seus impactos sobre a fisiologia e a produtividade das leveduras.

**Tabela 1.** Principais fatores que afetam diretamente o processo de crescimento da levedura e sua capacidade fermentativa<sup>1</sup>.

Fator	Impacto nas leveduras
Baixo pH	Interfere no transporte de íons e na regulação intracelular, gerando estresse adicional.
Oscilações de temperatura	O estresse térmico pode causar desnaturação de enzimas e inativar mecanismos celulares críticos.
Pressão osmótica elevada	Compromete o transporte de nutrientes e água, afetando o metabolismo celular e reduzindo a eficiência fermentativa.
Alta concentração de etanol	Inibe o crescimento celular e afeta a viabilidade, especialmente acima de 10% (v/v).
Composição do mosto	Nutrientes insuficientes ou compostos inibitórios, como sulfito e metais pesados, afetam a eficácia fermentativa.
Presença de contaminantes	Competem com as leveduras por nutrientes e produzem compostos indesejáveis, como ácidos orgânicos e acetato.

<sup>1</sup>Baseado em Amorim; Basso; Lopes (2009); Mager; Siderius (2002); Narendranath *et al.* (1997); Oliva-Neto; Yokoya (1997); Reis *et al.* (2017).

A composição do mosto exerce influência direta no desempenho fermentativo. O caldo de cana e o melaço apresentam perfis químicos distintos: enquanto o caldo caracteriza-se por menores concentrações de compostos inibitórios, sua qualidade nutricional é suscetível a variações sazonais que podem impactar o rendimento. Em contrapartida, o melaço — subproduto da fabricação do açúcar — apresenta elevada concentração de sais e substâncias, a exemplo do sulfito, que podem ser tóxicos às leveduras em determinadas dosagens (Amorim; Basso; Lopes, 2009).

A estratégia de combinar caldo e melaço visa equilibrar o aporte nutricional e mitigar os efeitos tóxicos sobre as leveduras. Essa redução da toxicidade ocorre pela diluição de componentes inibitórios intrínsecos ao melaço, como sais e sulfitos, cujas concentrações são reduzidas a níveis toleráveis ao metabolismo celular quando misturadas ao caldo (Ceccato-Antonini, 2021). Além do equilíbrio químico, a composição do mosto misto é fundamental para o ajuste do teor de sólidos solúveis totais (°Brix); visto que o melaço possui uma concentração de açúcares excessivamente elevada, a adição de caldo permite atingir a densidade ideal de fermentação, prevenindo o estresse osmótico e assegurando a viabilidade das células ao longo dos ciclos.

Fatores químicos do meio, como baixo pH e presença de metais, afetam o metabolismo e a integridade celular. Entre os metais, sendo encontrado com relativa frequência no caldo de cana, o alumínio tem sido apontado como prejudicial, mesmo em baixas concentrações, por sua capacidade de interferir em componentes celulares essenciais (Ceccato-Antonini, 2021). Além disso, o baixo pH potencializa a toxicidade de ácidos orgânicos (por exemplo, ácido láctico e acético), que quando acumulados aumentam a vulnerabilidade das leveduras ao etanol e reduzem sua viabilidade e atividade metabólica (Oliva-Neto *et al.*, 2013).

A contaminação microbiológica constitui um risco crítico para processos industriais de produção de etanol. Espécies como *Dekkera bruxellensis* e *Limosilactobacillus fermentum* competem por substrato com a *Saccharomyces cerevisiae*, produzindo metabólitos indesejáveis (por exemplo, ácidos orgânicos e acetato) e, conseqüentemente, reduzindo o rendimento fermentativo (Bayrock; Ingledew, 2004; Bischoff *et al.*, 2009). Lucena *et al.* (2010), ao analisar 489 isolados de quatro destilarias (2007–2008), verificaram que bactérias lácticas podem atingir até  $8,9 \times 10^8$  UFC/mL nas dornas de fermentação e  $6,0 \times 10^8$  UFC/mL no caldo de cana bruto, com *L. fermentum* como a espécie mais frequente. Relatos industriais e experimentais indicam prejuízos substanciais: estimativas apontam perdas diárias da ordem de 20.000 L de etanol em condições industriais, aumentos significativos da glicose residual e quedas de rendimento de até  $\approx 27\%$  em contaminações intensas (Amorim; Basso; Lopes, 2009; Bischoff *et al.*, 2009). Esses efeitos decorrem tanto da competição direta pelo substrato quanto do acúmulo de ácido láctico, que compromete

funções metabólicas essenciais das leveduras (Narendranath *et al.*, 1997; Oliva-Neto; Yokoya, 1997).

A concentração de etanol constitui um importante fator limitante para *S. cerevisiae*: concentrações superiores a 10% (v/v) prejudicam a viabilidade celular, efeito que se intensifica em temperaturas elevadas (Reis *et al.*, 2017). A faixa térmica ideal para a fermentação industrial situa-se entre 26 °C e 35 °C; contudo, o caráter exotérmico do processo pode elevar a temperatura até aproximadamente 38 °C, o que exige sistemas de resfriamento para mitigar o estresse térmico sobre as leveduras (Lima; Basso; Amorim, 2001).

O estresse osmótico, decorrente de elevadas concentrações iniciais de açúcar, representa outro desafio crítico à fermentação. Concentrações de açúcares redutores totais (ART) superiores a 120 g/L podem provocar a perda de água celular por osmose e o comprometimento da viabilidade da levedura (Mager; Siderius, 2002). No ambiente industrial, esse parâmetro é monitorado através do teor de sólidos solúveis totais. Considerando que 120 g/L de açúcares equivalem, de maneira aproximada e simplificada, a 12° Brix, observa-se que mostos com gradações superiores elevam a pressão osmótica do meio, exigindo maior robustez da cepa para evitar a plasmólise e garantir a eficiência metabólica. Esse estresse frequentemente atua sinergicamente com a presença de ácidos orgânicos e altos teores de etanol, aumentando a toxicidade do meio. Para mitigar tais efeitos, as práticas industriais adotam sistemas de batelada alimentada, que permitem um controle mais rigoroso das condições operacionais e maior eficiência fermentativa (Graves *et al.*, 2006). A superioridade desse sistema reside, em grande parte, na promoção da adaptação celular: ao fornecer o substrato de maneira gradual, evita-se a exposição imediata das leveduras a choques osmóticos severos. Esse fornecimento controlado permite que o microrganismo ajuste seu metabolismo e a composição de sua membrana plasmática de forma progressiva, estabelecendo uma resposta adaptativa que mantém a homeostase interna e a viabilidade celular mesmo diante do incremento na concentração de etanol e de metabólitos inibitórios ao longo do ciclo. Paralelamente, avanços em seleção e melhoramento têm produzido estirpes com maior resistência a esses desafios.

Desde meados dos anos 2000, a adoção de leveduras comerciais selecionadas e adaptadas às condições locais das destilarias cresceu de importância (Ceccato-Antonini, 2021). A seleção natural por meio do reciclo celular e da exposição a estresses industriais favoreceu a predominância de linhagens adaptadas. Entre as cepas industriais amplamente utilizadas no Brasil destacam-se PE-2 e CAT-1, reconhecidas por sua capacidade de adaptação, alto rendimento fermentativo e dominância ao final dos ciclos (Basso *et al.*, 2008).

A cepa PE-2 tem sido associada à maior tolerância a ambientes ácidos, um caráter que tende a ser favorecido em processos que empregam tratamento ácido do fermento (acidificação com  $H_2SO_4$ ) durante o reciclo celular (Della-Bianca et al., 2014; Reis et al., 2017). A manutenção de altas taxas de viabilidade ao longo dos ciclos é fundamental para a estabilidade do processo e para minimizar quedas de rendimento (Amorim et al., 2011).

A viabilidade celular é um parâmetro crítico no contexto do reciclo, pois, células viáveis sustentam a continuidade dos ciclos fermentativos ao longo da safra (Ceccato-Antonini, 2021). A redução da viabilidade indica perda de tolerância ao ambiente operacional e compromete o desempenho da linhagem, sendo, portanto, um indicador valioso para intervenção operacional ou substituição de levedo (Amorim; Gryscek; Lopes, 2010).

### 3.3 Tratamento celular com ácido sulfúrico na fermentação

O controle de microrganismos contaminantes nas dornas de fermentação é essencial para assegurar a eficiência do processo. No Brasil, práticas antimicrobianas adotadas pela indústria sucroalcooleira incluem a acidificação com ácido sulfúrico e, historicamente, o uso de antibióticos, visando reduzir a carga bacteriana e preservar o desempenho fermentativo (Ceccato-Antonini, 2018). Entre essas alternativas, a acidificação com  $H_2SO_4$  aplicada ao fermento ao final de cada ciclo tem demonstrado eficácia no controle de bactérias contaminantes e na desfloculação associada a infestações bacterianas (Basso et al., 2008; Wheals et al., 1999).

A produção de etanol no Brasil enfrenta desafios significativos relacionados à contaminação microbiana, presentes desde as etapas iniciais no campo até o processo de fermentação. Esse problema é amplificado pelas condições não assépticas que caracterizam a colheita, o tratamento do substrato e a condução do bioprocessamento (Silva-Neto et al., 2020).

Microrganismos como *Lactobacillus* e *Bacillus* estão entre os contaminantes mais comuns, sendo a espécie *L. fermentum* frequentemente destacada como um dos principais responsáveis pela redução da eficiência fermentativa. A presença desse contaminante pode levar a perdas expressivas, com diminuições de até 30% no rendimento da produção de etanol (Brexó; Sant'Ana, 2017).

Após a separação do vinho das células ao término do ciclo, forma-se um “creme de leveduras” com elevada concentração de sólidos (tipicamente relatada na faixa de 60–70% m/v), que é submetido à acidificação até pH ~1,8–2,8 por períodos tipicamente entre 1,5 e 3 h antes de seu retorno à dorna. Estudos reportaram efeitos relevantes: Gallo (1989) observou redução de 44,6% no número de células bacterianas após acidificação, enquanto outros trabalhos registraram reduções de 3 ciclos log ( $\approx 99,9\%$ ) para *L. fermentum* com protocolos semelhantes (Costa; Cerri; Ceccato-Antonini, 2018; Silva-Neto et al., 2020).

Embora *S. cerevisiae* apresente maior tolerância a baixos valores de pH em comparação com muitas bactérias contaminantes, a exposição a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pode provocar danos fisiológicos em leveduras, variando conforme o estado fisiológico (fração de células jovens versus senescentes), tempo de exposição e intensidade do tratamento (Oliva-Neto *et al.*, 2013). A resistência ao estresse ácido tem sido relacionada à presença de reservas de carboidratos (glicogênio, trealose) e a mecanismos de proteção celular que mitigam a perda de integridade da membrana e o colapso metabólico (Basso *et al.*, 2008).

Alguns autores sugerem que a acidificação tende a “selecionar” subpopulações mais robustas, reduzindo a fração de células senescentes e, assim, potencialmente preservando desempenho fermentativo nos ciclos subsequentes (Gomes *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2011). Entretanto, as evidências experimentais diretas sobre a eliminação seletiva de células envelhecidas são ainda limitadas, e os efeitos sobre viabilidade, vitalidade e produtividade demandam avaliações integradas (Kamei *et al.*, 2014).

### **3.4 Viabilidade e vitalidade celular em *Saccharomyces cerevisiae***

Em diferentes áreas do conhecimento, termos como vitalidade e viabilidade podem receber definições distintas ou até divergentes dentro de uma mesma área. No campo dos microrganismos, esse desacordo é documentado por Bouix *et al.* (2022), os quais empregam as categorias culturabilidade, viabilidade e vitalidade de forma diversa daquela adotada por Kwolek-Mirek e Zadrag-Tecza (2014). Para Bouix *et al.* (2022), culturabilidade refere-se à capacidade de uma célula se dividir em meio sólido e formar colônias; viabilidade envolve integridade de membrana, capacidade de síntese proteica e produção de energia; e vitalidade diz respeito à capacidade de gerar energia, ao comportamento dinâmico da cultura e aos parâmetros cinéticos (taxas específicas de crescimento, produção de metabólitos e consumo de substrato). Assim, segundo esses autores, em uma mesma população podem coexistir células vivas — identificáveis por técnicas de coloração, porém incapazes de se dividir e formar colônias — o que as torna indetectáveis por métodos baseados em cultivo, além de outras subpopulações com atividades metabólicas heterogêneas.

Segundo Kwolek-Mirek e Zadrag-Tecza (2014), viabilidade é entendida como a proporção de células vivas capazes de reproduzir-se em meios sólidos ou líquidos, estando relacionada à integridade da membrana e à contagem de células vivas e mortas. Vitalidade, por sua vez, refere-se à capacidade funcional e fisiológica das células, isto é, às alterações intracelulares ou metabólicas que podem comprometer a divisão celular sem necessariamente causar morte. Em muitos cenários, efeitos tóxicos reduzem primeiro a vitalidade antes de culminarem na perda da viabilidade, o que ressalta a importância de distinguir esses parâmetros para interpretar corretamente os resultados experimentais.

Compreender como viabilidade e vitalidade se manifestam sob diferentes estresses é crucial em contextos industriais. A queda na capacidade reprodutiva e na sobrevivência observada ao longo de um bioprocessamento costuma refletir em fatores que afetam negativamente ambos os atributos. Por isso, para avaliar adequadamente como um microrganismo expressa suas características, torna-se necessário também quantificar sua longevidade reprodutiva e padrões de replicação no sistema estudado. As Tabelas 2 e 3 resumem os principais métodos empregados para análise de viabilidade e vitalidade em leveduras.

**Tabela 2.** Principais métodos utilizados em processos fermentativos para determinação de viabilidade celular<sup>1</sup>.

Método	Breve descrição
Contagem de unidades formadoras de colônia (U.F.C)	Este teste conta o número de colônias que crescem em um meio de cultura após a incubação de uma amostra de células. Cada colônia surge de uma única célula viável.
<i>Spotting Test</i>	Diferentes diluições de uma cultura de células são depositadas sobre o meio em uma placa de Petri. Ele permite a observação visual da capacidade das células de crescer em condições específicas.
Zona de Inibição de Crescimento	Esse teste avalia a capacidade das células de crescer em torno de um disco impregnado com uma substância inibitória, como um antibiótico. A presença ou ausência de crescimento indica a sensibilidade ou resistência das células ao composto testado.
<i>Temporal-Lapse Photomicroscopy</i>	Este método utiliza microscopia para observar células ao longo do tempo em presença de um corante vital, como a floxina-B. Ele permite a diferenciação entre células vivas e mortas com base na capacidade de reprodução e na integridade celular.
Iodeto de Propídio/Fluoresceína	Esses corantes são usados para avaliar a integridade da membrana celular. O iodeto de propídio penetra em células mortas ou danificadas, enquanto a fluoresceína marca células metabolicamente ativas.
Azul de Metileno/Eritrosina	Estes corantes são empregados para identificar células mortas, que são coradas de azul/rosa, enquanto células vivas permanecem incolores.

<sup>1</sup>Baseado em Eigenfeld *et al.* (2023); Kwolek-Mirek; Zadrag-Tecza (2014); Stewart (2017).

**Tabela 3.** Principais métodos utilizados em processos fermentativos para determinação de vitalidade celular<sup>1</sup>.

Método	Breve descrição
Atividade Metabólica	Este teste avalia a capacidade das células de realizar reações metabólicas, como produção de energia e síntese de biomoléculas.
Atividade Enzimática	Avalia a atividade de enzimas específicas dentro das células, o que pode ser indicativo do estado metabólico e da vitalidade celular.
Cultura em Meio Líquido	Neste teste, as células são incubadas em um meio de cultura líquido e o crescimento é monitorado ao longo do tempo por meio de medições de densidade óptica ou contagem de células.
Conteúdo de ATP	O ATP é uma molécula energética fundamental para as células. A medição do conteúdo de ATP pode indicar a capacidade das células de produzir e utilizar energia.
Potencial da Membrana Mitocondrial	Este teste avalia a integridade e o funcionamento das mitocôndrias, que são organelas responsáveis pela produção de energia na célula. Um potencial de membrana mitocondrial saudável é essencial para a função celular adequada.

<sup>1</sup>Baseado em Eigenfeld *et al.* (2023); Kwolek-Mirek; Zadrag-Tecza (2014); Stewart (2017).

Em *S. cerevisiae*, a vida reprodutiva replicativa (*replicative lifespan*) corresponde ao número de gerações que uma célula-mãe pode originar antes de cessar a divisão - tipicamente cerca de 25 gerações em estirpes selvagens, com máximos em torno de 40 gerações (Lesur; Campbell, 2004). Kamei *et al.* (2014) observaram que alterações metabólicas associadas ao envelhecimento surgem já a partir da 11<sup>a</sup> geração, incluindo maior atividade do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, redução na síntese de aminoácidos de cadeia ramificada e diminuição do glicogênio intracelular.

Após cada replicação, a célula-mãe forma um anel cicatricial de quitina e glucana na parede celular, intitulada de cicatriz de brotamento (Bacon *et al.*, 1966; Cabib *et al.*, 1997). Essas cicatrizes acumulam-se ao longo das divisões, e o número de brotamentos que uma célula realiza é condicionado por fatores genéticos, morfológicos, fisiológicos e ambientais (Eigenfeld; Kerpes; Becker, 2021). Brotos jovens não apresentam cicatrizes de brotamento; existem também as chamadas cicatrizes de nascimento (*birth scars*), que por não conterem

quitina, não são detectadas por corantes que marcam essa estrutura e não se correlacionam com o histórico reprodutivo da célula (Powell; Quain; Smart, 2003). Por isso, a contagem de cicatrizes de brotamento é um indicador prático do envelhecimento reprodutivo (*replicative age*) e ajuda a inferir sinais de senescência celular atuantes sobre a viabilidade e vitalidade em colônias.

Os métodos para avaliar viabilidade incluem técnicas de crescimento em meios sólidos e líquidos e ensaios com corantes. Técnicas de crescimento informam sobre células capazes de formar colônias, porém são lentas e não detectam células metabolicamente ativas incapazes de se dividir. Ensaios com corantes (colorimétricos ou fluorescentes) oferecem respostas rápidas e objetivas, discriminando células vivas e mortas com base na integridade da membrana ou no metabolismo celular (Eigenfeld *et al.*, 2023; Kwolek-Mirek; Zadrag-Tecza, 2014).

O azul de metileno é reduzido por células metabolicamente ativas, tornando-as incolores; células sem atividade enzimática permanecem coradas e são consideradas mortas (Lee; Robinson; Wang, 1981). Contudo, em processos com ciclos sucessivos — onde as células enfrentam estresses como alta concentração de açúcar, etanol e pH baixo — muitas células ficam fisiologicamente fragilizadas, apresentando coloração intermediária ou mais clara com azul de metileno e podem ser classificadas como “mortas”, embora se recuperem ao serem plaqueadas em meio rico (YPD), formando colônias. Essa limitação introduz subjetividade e possibilidade de falsos-positivos, dependentes do tempo de exposição ao corante (Feizi *et al.*, 2016).

A eritrosina é uma alternativa que tingem células mortas em rosa-avermelhado, oferecendo contraste mais nítido, menor exigência de reagentes e menor tendência a classificar equivocadamente células fragilizadas; além disso, não provoca o esverdeamento observado com azul de metileno em meios com alta concentração de açúcar (Martínez *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 1996).

A avaliação da vitalidade foca nas capacidades funcionais das células e inclui métodos como mensuração de ATP intracelular, potencial de membrana mitocondrial, ensaios de atividade enzimática e o teste de poder de acidificação. Este último, amplamente empregado na indústria cervejeira, estima a atividade fermentativa por meio da redução do pH extracelular após a adição de glicose (Kwolek-Mirek; Zadrag-Tecza, 2014; Stewart, 2017).

O termo *viable but non culturable*, VBNC, refere-se a células que mantêm integridade estrutural e sinais de atividade metabólica, mas apresentam perda temporária da capacidade de formar colônias em placas (Liu *et al.*, 2023). Em termos fisiológicos, o estado VBNC constitui uma resposta ao estresse ambiental em que a célula reduz funções

proliferativas e reorienta o metabolismo para manutenção, muitas vezes de forma reversível após a remoção do estressor (Liu *et al.*, 2023).

Em leveduras, evidências de VBNC foram obtidas experimentalmente mediante exposição a agentes estressores, seguida de recuperação da capacidade de crescimento em condições favoráveis (Salma *et al.*, 2013). Na prática, a identificação de VBNC exige a combinação de ensaios de culturabilidade com métodos independentes de avaliação da viabilidade e da vitalidade celular, tais como contagem microscópica com corantes diferenciais, ensaios de ATP intracelular, testes de atividade enzimática, protocolos de reativação em meio rico, análise de padrões de velocidade de crescimento e citometria de fluxo (Pinto; Santos; Chambel, 2015). Assim, discrepâncias entre contagens por UFC e medidas de viabilidade microscópica podem indicar a presença de populações VBNC, cuja confirmação demanda ensaios complementares.

Por fim, tratamentos com ácido sulfúrico, comumente usados em processos industriais, têm sido associados à eliminação de células menos viáveis e à preservação de subpopulações mais robustas (Costa; Cerri; Ceccato-Antonini, 2018; Goldammer, 2022; Lorenzi, 2021). Entretanto, são necessários estudos adicionais para elucidar como esses tratamentos afetam de modo integrado viabilidade, vitalidade e desempenho fermentativo.

## 4 MATERIAIS E METODOS

A não ser quando especificado, os experimentos e análises foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) da UFSCar, CCA-Campus Araras.

### 4.1 Microrganismos

As cepas de *S. cerevisiae* (linhagens industriais PE-2 e CAT-1) foram obtidas do banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) da UFSCar, CCA-Campus Araras. As leveduras foram armazenadas em meio YPD (*Yeast extract, Peptone, Dextrose*), composto por 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona e 20 g/L de ágar, mantidas em *slants* a 4°C.

### 4.2 Fermentação em batelada com reciclo celular e tratamento ácido

Para a propagação das leveduras, duas alçadas foram inicialmente cultivadas em 125 mL de meio YPD contendo 4% de glicose em Erlenmeyer de 250 mL. As culturas foram incubadas a 30°C, com agitação constante a 200 rpm, durante 24 h. Após esse período, 100 µL da cultura inicial foram transferidos para 1 L de caldo de cana esterilizado com aproximadamente 13° Brix, dentro de Erlenmeyer de 2 L. A utilização dessa concentração específica justifica-se pela necessidade de fornecer um aporte energético adequado para a multiplicação celular, mantendo, simultaneamente, o meio em uma faixa de baixa pressão osmótica. A etapa de propagação ocorreu por 72 h sob as mesmas condições de temperatura, com agitação ocasional para facilitar a liberação de CO<sub>2</sub>. Concluído o processo, as células foram separadas por decantação, o vinho foi armazenado, e a biomassa foi ajustada para 4 g de massa úmida, correspondente a uma concentração de 1x10<sup>9</sup> a 2x10<sup>9</sup> células por mL, sendo posteriormente acondicionada em tubos Falcon de 50 mL.

Os experimentos fermentativos foram realizados em triplicata, seguindo a metodologia descrita por Raghavendran *et al.* (2017). Inicialmente foi montado o pé-de-cuba da seguinte maneira: cada tubo Falcon de 50 mL continha aproximadamente 4 g de levedura em massa úmida, 2 mL de vinho (advindo da propagação) e aproximadamente 6 mL de água destilada estéril. O teor alcoólico final do pé-de-cuba foi ajustado para 5% (v/v) com etanol absoluto com base no teor alcoólico do vinho coletado, subtraindo-se proporcionalmente o volume de água. Foram adicionados 9,25 mL de caldo de cana esterilizado (14,5 g/100 mL de açúcar redutor total) em três momentos distintos: nos tempos 0, 2 e 4 h. Os tubos foram mantidos a 30°C, agitados periodicamente e pesados antes e depois da adição do caldo a cada 2 h, ao longo de 10 h, para monitorar a liberação de CO<sub>2</sub>.

Após esse período, os tubos foram retirados da incubadora, mantidos em temperatura ambiente até o dia seguinte (20 h no total) e novamente pesados.

Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 2.000 x g, com os sobrenadantes (vinho) sendo armazenados a -20°C para posterior análise das variáveis teor alcoólico, açúcar redutor total e pH. Os tubos foram pesados somente com a massa celular úmida advinda da pós-fermentação e iniciou-se o tratamento ácido, consistindo na adição de 2 mL de vinho (advindo da propagação), 6 mL de água e solução de ácido sulfúrico 1 N até pH 2,5, monitorando-se por meio do pH-metro. O teor alcoólico final foi ajustado com etanol absoluto com base no teor alcoólico do vinho coletado, subtraindo-se proporcionalmente o volume de água. Os tubos foram mantidos por 2 h a 30°C. Para o experimento controle, não foi adicionada a solução de ácido sulfúrico. Os tubos foram então homogeneizados e um volume de 100 µL foi retirado para as análises de viabilidade celular (por plaqueamento e contagem de células ao microscópio), testes de crescimento em meio líquido e contagem de cicatrizes de brotamento, após centrifugação e lavagem com solução salina 0,85%.

Em seguida foi iniciada a alimentação com caldo conforme descrito anteriormente, e esse procedimento (ciclo fermentativo e tratamento celular) foi repetido por um total de 6 ciclos fermentativos e 6 ciclos de tratamento.

### **4.3 Análises de viabilidade e vitalidade celular**

#### **4.3.1 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)**

O procedimento para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizado a partir de amostras da biomassa celular, as quais foram diluídas em série utilizando solução salina contendo 0,85% de NaCl. As diluições foram plaqueadas em duplicata em meio YPD, utilizando o método de semeadura em superfície. As placas foram incubadas a 30°C por um período de 72 h. Após o término da incubação, o número de colônias formadas foi contado, e os resultados foram expressos como UFC/mL.

#### **4.3.2 Coloração com corante Eritrosina**

A solução estoque de eritrosina B foi preparada dissolvendo-se 0,1 g de eritrosina B em 100 mL de PBS 1x (pH 7,2), obtendo-se concentração de 0,1% (m/v); a solução foi acondicionada em frasco âmbar e conservada a 4 °C, protegida da luz. Para avaliação da viabilidade, as amostras de levedura foram homogeneizadas e, quando necessário, diluídas na proporção apropriada. Em tubos de ensaio, transferiu-se 1 mL da suspensão celular e adicionou-se 1 mL da solução estoque de eritrosina (razão 1:1, v/v); as misturas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente (Martins *et al.*, 2024). Após a incubação, procedeu-se à contagem em câmara de Neubauer sob microscópio óptico (objetiva 40x).;

durante a análise consideradas células viáveis aquelas não coradas e células inviáveis as que apresentaram coloração róseo-avermelhada, além de contabilizar células com brotos. Os resultados foram expressos em número de células vivas/mL, viabilidade (%) e brotamento (%), conforme descrito por Ceccato-Antonini (2021), seguindo as seguintes fórmulas:

- Viabilidade (%) =  $(n^{\circ} \text{ de células viáveis} / (n^{\circ} \text{ de células viáveis} + n^{\circ} \text{ de células não viáveis})) \times 100$ .
- Brotamento (%) =  $(n^{\circ} \text{ de células viáveis em brotamento} / \text{total de células viáveis}) \times 100$ .
- Células viáveis/mL =  $\Sigma \text{ número de células contadas em 5 quadrículos} \times 5 \times 10^4 \times \text{diluição}$ .

#### 4.3.3 Crescimento em meio líquido

As amostras de massa celular foram padronizadas para uma concentração inicial de  $1 \times 10^7$  células/mL em meio YPD líquido e constituíram o inóculo para o teste de crescimento em meio líquido.

Em condições assépticas, adicionou-se 180  $\mu\text{L}$  de meio YPD estéril e 20  $\mu\text{L}$  do inóculo a cada poço de uma microplaca esterilizada de 96 poços, modelo "Costar 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene". Como controle negativo, utilizou-se meio YPD sem adição de inóculo. Após a montagem, a microplaca foi incubada na leitora de microplacas Tecan Infinite® M200 a 30°C, com agitação, por um período de 24 h. A absorbância foi medida a 600 nm em intervalos de 15 minutos, gerando as curvas de crescimento da levedura após cada ciclo de tratamento, ao longo dos ciclos celulares. Foram analisadas as amostras retiradas do pé-de-cuba e dos ciclos fermentativos 1 e 6.

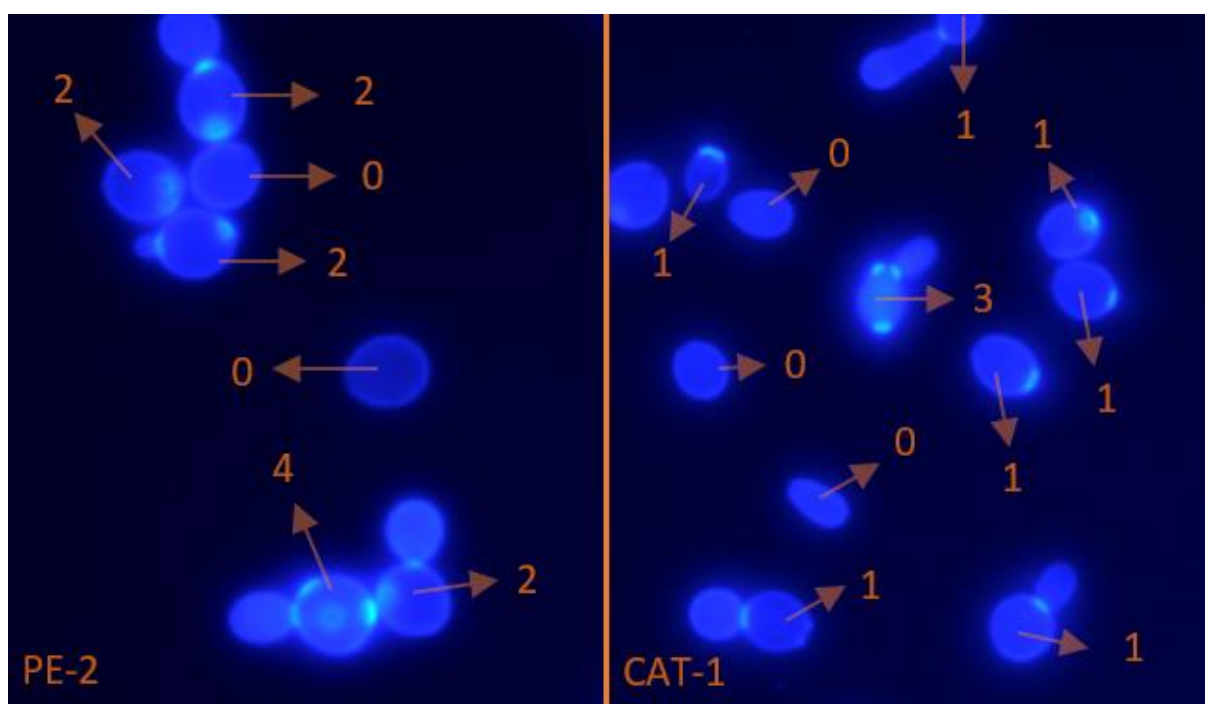
Os valores de absorbância foram transformados em  $\ln$  para análise dos dados. A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ,  $\text{h}^{-1}$ ) foi determinada pela regressão linear dos dados de  $\ln$  da absorbância em função do tempo durante a fase exponencial de crescimento, sendo o coeficiente angular da reta correspondente ao  $\mu_{\text{max}}$ . Foram também determinadas a duração da fase lag (h) e a variação da absorbância (absorbância ao final de 15 h – absorbância a 0 h) para cada amostra. O tempo de 15 h para avaliar a variação da absorbância foi estabelecido com base no menor período de tempo em que ocorreu a estabilização dos valores de absorbância.

#### 4.3.4 Contagem de cicatrizes de brotamento

Foi preparada uma solução de Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich®) a 10 mg/mL. Uma suspensão contendo 1 mL com  $10^6$  células/mL de levedura foi lavada com 150  $\mu$ L de sorbitol 1 M e ressuspensa em 150  $\mu$ L da solução corante, mantendo-se a suspensão a 4 °C por 5 min (Lesur; Campbell, 2004). Em seguida realizaram-se quatro lavagens sucessivas com sorbitol 1 M; as células foram então ressuspensas em 20  $\mu$ L da mesma solução e observadas em microscópio de fluorescência Leica Microsystems DM4000 B LED, utilizando o cubo de fluorescência A4 (faixa de excitação UV; filtros BP 340/40, RKP 400, BP 470/40). Os ajustes de aquisição utilizados foram: tempo de exposição = 432,6 ms; ganho (*gain*) = 1,2x; saturação = 1,00; gama = 0,70. Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Microscopia e Caracterização de Materiais (LabMiCam), UFSCar, CCA-Campus de Araras

Diferentes campos de avaliação ao microscópio foram fotografados (captura de imagens) e as imagens foram analisadas avaliando-se um número de 100 células de leveduras, contabilizando o número de cicatrizes de brotamento em cada uma das células (Figura 1). Os resultados foram analisados por meio da frequência do número de células em função do número de cicatrizes de brotamento (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 cicatrizes) no total de 100 células.

**Figura 1.** Visualização de células de *S. cerevisiae* das cepas industriais PE-2 (à esquerda) e CAT-1 (à direita), coradas com *Calcofluor White M2R*. O corante se liga à quitina, evidenciando as cicatrizes de brotamento (setas), que aparecem como regiões fluorescentes na parede celular. Os números indicam a quantidade de cicatrizes observadas por célula.



Fonte: Imagens do autor (2025).

#### 4.4 Análise da fermentação

Amostras dos sobrenadantes obtidos após cada ciclo fermentativo foram destiladas e o teor alcoólico foi determinado em densímetro digital Anton-Paar. O pH final foi determinado em pH-metro digital. A concentração de açúcar redutor total foi determinada após hidrólise das amostras com ácido clorídrico e quantificação pelo método do ácido-3,5-dinitrossalicílico (Miller, 1959).

O rendimento (g etanol produzido/g açúcar redutor total consumido) foi calculado seguindo a fórmula descrita em Raghavendran *et al.* (2017):

$$\text{RENDIMENTO DE ETANOL} = K \times \{(V_w + 0.7 \times P) \times ET - (2 + 0.7 \times P_p) \times ET_p\}$$

$$K = \frac{10,000}{64.75 \times V_s \times TRS}$$

onde:

$V_w$  = volume (mL) de vinho centrifugado;

$P$  = biomassa úmida de levedura peletizada (g);

$ET$  = etanol no vinho centrifugado (% v/v) ao final;

$P_p$  = biomassa de levedura peletizada do ciclo anterior (g);

$ET_p$  = título de etanol (% v/v) no vinho centrifugado do ciclo anterior (inóculo);

$V_s$  = volume do substrato (ml);

$TRS$  = açúcares redutores totais do substrato (g/100 ml).

#### 4.5 Análise estatística

Para todas as variáveis estudadas, foi calculada a média das triplicatas e o desvio-padrão, em cada ciclo fermentativo, para cada um dos tratamentos utilizados na fermentação (com ou sem ácido). Os resultados foram avaliados por Análise de Variância para dois fatores (*two-way anova*), considerando-se 'Ciclo' e 'Tratamento' como os fatores. Utilizou-se o *software Past (Palaeontological Statistics)*, versão 4.03 (Hammer; Harper; Ryan, 2001) para a análise estatística. Os resultados foram apresentados mostrando a significância ao nível de 5% para cada fator e variável estudada.

Para avaliar o efeito do tratamento (com e sem ácido) na frequência de células em relação ao número de cicatrizes de brotamentos, aplicou-se o teste de Qui-Quadrado para tabelas de contingência. O nível de significância utilizado foi de 5%. Com o intuito de verificar a diferença entre tratamentos, diversas hipóteses foram testadas, a saber: i) comparação entre tratamentos considerando a combinação entre leveduras e ciclos

fermentativos; ii) comparação entre tratamentos considerando a combinação apenas dos ciclos de fermentação (independente das leveduras); iii) comparação global, em que se considera conjuntamente todos os ciclos de fermentação e ambas as leveduras. A estatística de Qui-Quadrado foi calculada com  $i-1$  graus de liberdade, onde  $i$  representa o número de categorias não nulas para as cicatrizes de brotamento (total de oito categorias, variando de zero a sete). Todos os testes foram conduzidos no software *R*, utilizando a função `chisq.test`.

A relação 'número de cicatrizes de brotamento por número de células' foi calculada fazendo a somatória do número de cicatrizes multiplicado pelo número de células em cada categoria e dividindo pelo número total de células (número de 100). Os resultados foram avaliados por Análise de Variância para um fator (*one-way anova*), considerando-se 'Tratamento' como fator. Utilizou-se o software *Past (Palaeontological Statistics)*, versão 4.03 (Hammer; Harper; Ryan, 2001) para a análise estatística.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito do tratamento ácido sobre a levedura industrial PE-2

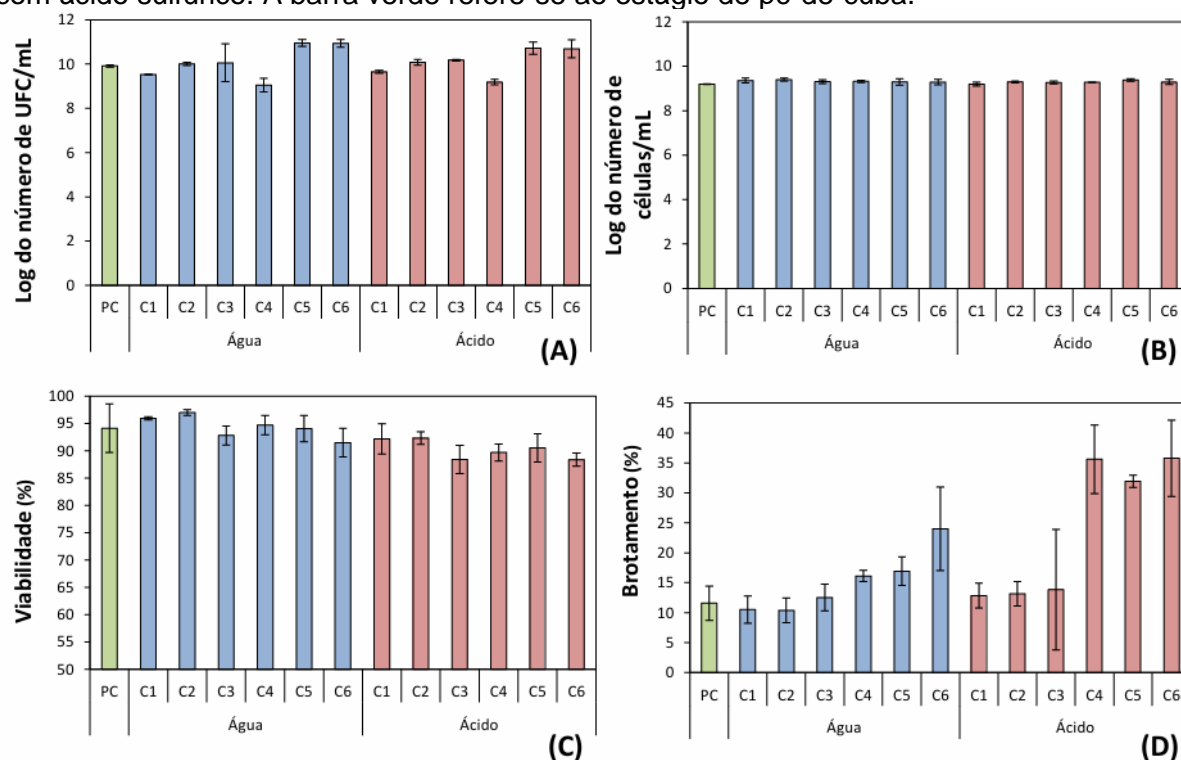
Os experimentos tiveram como objetivo investigar o efeito do tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,5; 2 h) sobre as linhagens industriais de *S. cerevisiae* PE-2 e CAT-1 durante fermentações em batelada alimentada com reciclo celular. Buscou-se avaliar, de forma isolada e combinada, os impactos dos reciclos e do tratamento ácido sobre parâmetros microbiológicos críticos, especialmente viabilidade e vitalidade celular. Além disso, o estudo teve como propósito identificar possíveis alterações no perfil fisiológico da população, incluindo a presença de células vivas, porém metabolicamente comprometidas, como aquelas incapazes de se dividir ou em estado de senescência. A hipótese central foi a de que a acidificação poderia modular a dinâmica de sobrevivência e atividade da levedura ao longo dos reciclos, resultando em mudanças no padrão de crescimento e na manutenção da eficiência fermentativa, efeitos que somente seriam evidenciados por uma análise integrada dos fatores principais e de suas interações.

No presente trabalho, foram considerados como indicadores de viabilidade: o número de UFC/mL (por plaqueamento em meio YPD), número de células viáveis/mL (por contagem em microscópio após coloração com eritrosina), e os percentuais de viabilidade e brotamento. Como indicadores de vitalidade, foram considerados os resultados de teor alcoólico/rendimento, parâmetros de crescimento em meio líquido (velocidade específica máxima de crescimento, duração de fase lag e variação de absorbância) e número de cicatrizes de brotamento.

Foi avaliada a culturabilidade (capacidade de formar colônia em meio sólido) das células por meio de crescimento em placas de Petri com YPD. No ensaio aqui empregado, ao final do sexto ciclo a linhagem PE-2 apresentou contagens médias de  $8,78 \times 10^{10}$  UFC/mL na fermentação sem tratamento ácido e  $4,92 \times 10^{10}$  UFC/mL na fermentação com tratamento ácido (Figura 2A), mas não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, houve efeito significativo dos ciclos sobre o número de UFC (Tabela 4). Houve queda até o quarto ciclo seguida de recuperação, terminando com valores superiores aos observados nos ciclos iniciais. O estresse fermentativo impõe pressão de seleção sobre a população de leveduras, favorecendo as subpopulações mais adaptadas ao bioprocessamento (Basso *et al.*, 2008). Em geral, a redução do número de UFC indica baixa adequação das células às condições operacionais, enquanto o aumento observado no presente experimento sugere que houve seleção de células capazes de se dividir e formar colônias ao longo dos reciclos.

Quanto ao número de células viáveis estimado por contagem em câmara de Neubauer após coloração com eritrosina, não foram detectadas diferenças significativas entre os ciclos, entre os tratamentos ou quanto à interação entre ambos (Figura 2B; Tabela 4). Importante destacar que, apesar da estabilidade da densidade celular, a contagem por UFC revelou um padrão distinto: a contagem em microscópio de células/mL manteve-se relativamente constante, porém apresentou valores ligeiramente inferiores às contagens de unidades formadoras de colônia. Essa discordância decorre das diferenças metodológicas: a contagem por UFC quantifica apenas as células capazes de proliferar em meio sólido — incluindo células em brotamento — enquanto a contagem microscópica com corantes avalia a integridade celular e a viabilidade imediata. Assim, algumas células podem manter integridade e atividade metabólica, mas exibir capacidade proliferativa reduzida em meio sólido em placa ou recuperar a habilidade de formar colônias apenas em meios ricos, o que explica a diferença entre as técnicas. Em conjunto, os resultados indicam que a população de PE-2 preservou uma proporção estável de células vivas ao longo dos ciclos, tanto no controle quanto sob tratamento ácido, evidenciando resiliência frente ao estresse fermentativo.

**Figura 2.** Log do número de UFC/mL, log do número de células/mL, viabilidade celular (%) e taxa de brotamento (%) da linhagem industrial CAT-1 ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba.



Quanto à viabilidade celular, no pé-de-cuba a viabilidade foi de 94,1%, sendo que ao final do sexto ciclo, os valores observados foram 91,4% na fermentação sem tratamento e 88,3% no tratamento com ácido sulfúrico. Houve diferença significativa entre os ciclos e os tratamentos, e em ambas as fermentações (com e sem tratamento ácido), a tendência foi de diminuição ao longo dos ciclos (Figura 2C; Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com ciclo celular (seis ciclos fermentativos) da linhagem industrial PE-2 em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).

Parâmetro	Two-way anova		
	Tratamento	Ciclo	Interação
Log número células/mL	n.s	n.s	n.s
Log número UFC/mL	n.s	*	n.s
Brotamento (%)	*	*	*
Viabilidade (%)	*	*	n.s
Teor alcoólico (g/100 mL)	n.s	*	n.s
Açúcar redutor total residual (g/100 mL)	n.s	*	*
pH final	*	*	*
Rendimento (g etanol/g açúcar redutor total)	n.s	n.s	n.s

n.s.= não significativo ( $p>0,05$ ); \*= significativo a 5% ( $p<0,05$ )

Pereira *et al.* (2011) relataram queda imediata da viabilidade por choque osmótico seguida de recuperação em aproximadamente 12 horas. Os autores ressaltam ainda que a morte de subpopulações sensíveis libera recursos que favorecem a proliferação de microrganismos mais resistentes, promovendo seleção e recuperação da culturabilidade. Os resultados com a linhagem PE-2 mostraram manutenção de elevada viabilidade até o sexto ciclo na fermentação sem tratamento ácido, sugerindo que, nas condições do protocolo empregado, a população foi capaz de recuperar sua atividade de forma eficaz, apesar das variações observadas ao longo dos ciclos.

Em relação ao brotamento, o percentual aumentou ao longo dos ciclos, sobretudo no tratamento sem ácido, passando de 11,56% no terceiro ciclo para 24,00% no sexto ciclo. No tratamento com ácido também houve aumento, finalizando com 35,79% no sexto ciclo (Figura 2D). A análise estatística indicou diferença significativa para ciclo, tratamento e interação significativa entre ciclo e tratamento (Tabela 4). Observou-se, portanto, aumento no número de células em brotamento durante a fermentação, com uma resposta mais acentuada nas condições submetidas ao tratamento com ácido sulfúrico. Esse

comportamento indica que a acidificação exerceu um estímulo sobre a atividade proliferativa das leveduras, resultando em índices de brotamento superiores quando comparados aos ensaios sem tratamento ácido.

Assim, os dados indicam uma seleção de subpopulações mais ativas à medida que os ciclos avançaram. Esse resultado, combinado com a análise de viabilidade, sugere que a linhagem PE-2 sofreu uma queda de viabilidade ao longo dos ciclos, enquanto a proporção de células capazes de brotar e formar colônias aumentou. Em contrapartida, apesar de redução na viabilidade percentual, principalmente quando empregado o tratamento ácido, verificou-se maior atividade reprodutiva conforme avançaram os ciclos, efeito que parece ter sido intensificado pela presença do ácido.

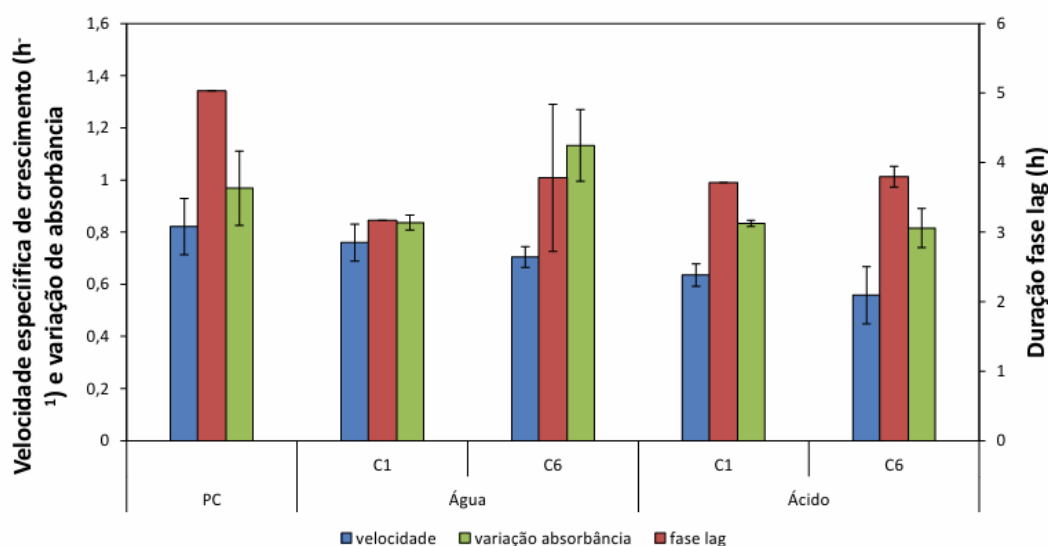
O perfil de crescimento em meio líquido foi monitorado em microplacas ao longo de 24 horas nas amostras de pé-de-cuba e ao final do primeiro e sexto ciclo de fermentação, permitindo avaliar parâmetros cinéticos fundamentais que caracterizam a dinâmica de crescimento celular: a velocidade específica máxima de crescimento, que indica a rapidez com que as células se dividem durante a fase exponencial; a duração da fase lag, representando o período de adaptação inicial antes do início da divisão ativa; e a variação da absorbância, refletindo as alterações na densidade celular ao longo do tempo.

Observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento apresentou diferença significativa em função do tratamento, havendo diminuição quando comparada à fermentação sem tratamento ácido. A variação de absorbância também mostrou diferença estatística, tanto para tratamento quanto para ciclo e para a interação entre ciclo e tratamento. Por outro lado, a duração da fase lag não apresentou diferença significativa para nenhum dos fatores analisados (Figura 3; Tabela 5). Os resultados da velocidade específica e absorbância são compatíveis com a atuação de uma forte pressão seletiva imposta pelo tratamento ácido e pelos reciclos: redução da fração sensível da população e um consequente aumento relativo da proporção de células em divisão (maior % de brotamento), ao mesmo tempo em que surgem indícios de comprometimento fisiológico (queda no  $\mu_{max}$ , redução da viabilidade e variações na culturabilidade).

Na Figura 4 são apresentados resultados de teor alcoólico, açúcares redutores totais residuais, pH final e rendimento. O teor alcoólico indica a eficiência da conversão dos açúcares em etanol, representando o produto final de maior interesse industrial. A concentração de açúcar redutor total residual, por sua vez, revela a capacidade da levedura em consumir o substrato disponível; valores mais baixos sugerem maior eficiência de utilização dos açúcares e, conseqüentemente, menor perda de matéria-prima. O pH final funciona como um parâmetro indireto tanto da atividade metabólica da levedura quanto da estabilidade do processo. Em cenários onde há o tratamento celular com ácido sulfúrico, esse valor também reflete como o tratamento contribui para a acidificação no processo,

fornecendo uma indicação importante do impacto dessa prática sobre o processo. Por fim, o rendimento (g etanol/g açúcar redutor total) é um indicador crítico, pois expressa a relação entre o etanol produzido e o substrato efetivamente consumido, permitindo avaliar se a cepa está direcionando seu metabolismo majoritariamente para a formação de etanol, desviando parte desse fluxo para outros compostos ou havendo perda deste açúcar para outros microrganismos. A análise conjunta desses resultados possibilita compreender não apenas a eficiência fermentativa, mas também a robustez da cepa frente às condições impostas.

**Figura 3.** Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ), variação de absorvância e duração da fase lag (h) da linhagem industrial PE-2 no estágio de pé-de-cuba (PC) e ao final dos ciclos 1 e 6 (C1 e C6) na fermentação em batelada alimentada.



**Tabela 5.** Resultado da análise estatística dos parâmetros analisados quanto ao crescimento em meio semissintético (YPD) das células da linhagem industrial PE-2 amostradas da fermentação em batelada alimentada com reciclo celular, após os ciclos fermentativos 1 e 6, em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).

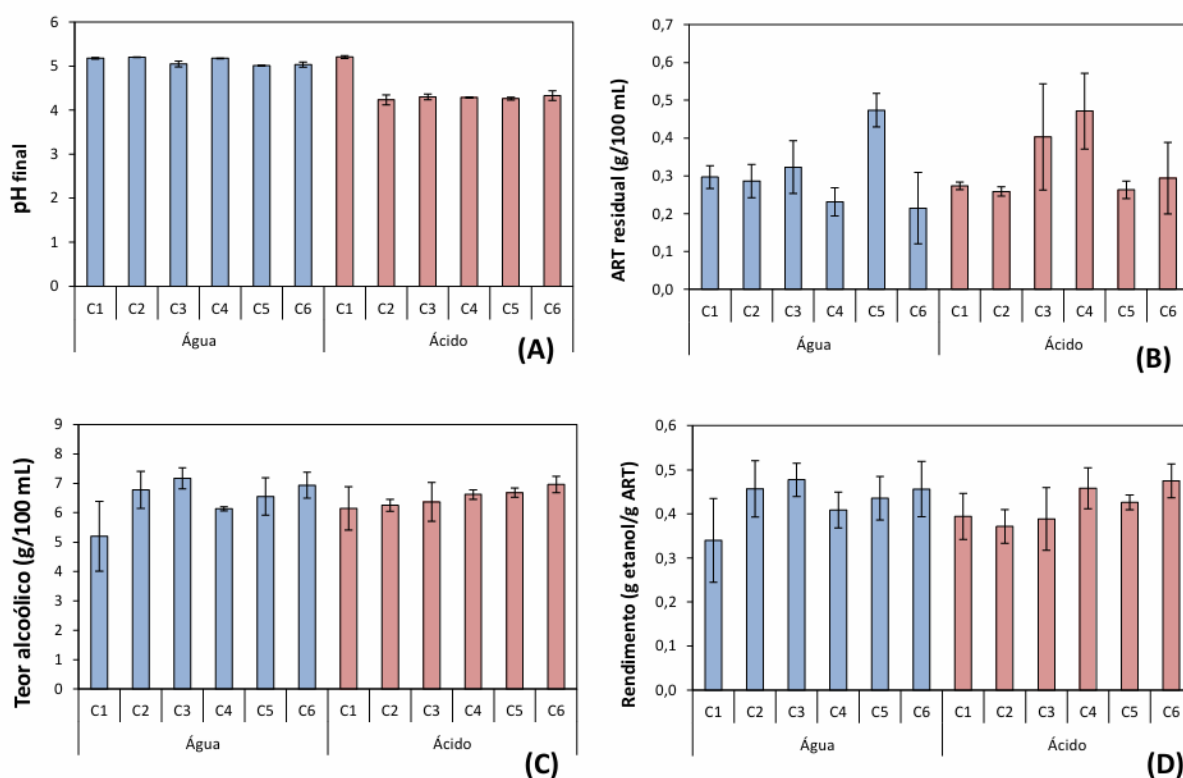
Parâmetro	Two-way anova		
	Tratamento	Ciclo	Interação
Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ )	*	n.s	n.s
Duração da fase lag (h)	n.s	n.s	n.s
Variação de absorvância	*	*	*

n.s.= não significativo ( $p>0,05$ ); \*= significativo a 5% ( $p<0,05$ )

Comparativamente, a fermentação com tratamento ácido exibiu redução de pH mais acentuada do que a fermentação sem tratamento ácido. A fermentação com tratamento

ácido apresentou uma queda de pH entre o primeiro e o segundo ciclo do que a fermentação controle, que exibiu variação moderada ao longo dos ciclos. No tratamento controle o pH médio iniciou em 5,10 no primeiro ciclo e finalizou em 5,03 no sexto ciclo. Na fermentação tratada com ácido sulfúrico o pH médio iniciou em 5,20 no primeiro ciclo e terminou em 4,30 no sexto ciclo (Figura 4A). Foram detectadas diferenças estatísticas significativas para os efeitos de tratamento, de ciclo e para a interação entre ciclo e tratamento (Tabela 4).

**Figura 4.** pH final, concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL), teor alcoólico (g/100 mL) e rendimento (g etanol/g ART) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com a linhagem industrial PE-2, lavada com água (barra azul) e com ácido sulfúrico (barra rosa).



Duas causas podem justificar essa redução: a produção de dióxido de carbono e a carga ácida introduzida pelo tratamento. A produção de dióxido de carbono durante a fermentação contribui para a queda de pH observada ao longo dos ciclos na fermentação sem tratamento ácido. O procedimento de tratamento celular do creme de leveduras até pH 2,5 e seu posterior processo de alimentação do mosto implicam a introdução de carga ácida residual no sistema; mesmo após diluição pela alimentação com caldo de cana, essa carga tende a reduzir o pH do processo fermentativo e a persistir nos ciclos seguintes, especialmente quando a capacidade tampão do mosto fermentativo é limitada.

A levedura *S. cerevisiae* apresenta crescimento adequado e eficiência fermentativa dentro de uma faixa de pH entre 4,0 e 6,0, sendo organismos acidofílicos que se desenvolvem melhor em condições levemente ácidas (Narendranath; Power, 2005). De acordo com Liu *et al.* (2015), essa levedura apresenta crescimento adequado e produção máxima de etanol em valores próximos de 4,9. Além disso, estudos de Lin *et al.* (2012) investigaram os efeitos de parâmetros como pH, temperatura e concentração de substrato na fermentação alcoólica utilizando a levedura *S. cerevisiae* BY4742, isolada da fermentação de vinho, demonstrando que pH abaixo de 3,0 pode causar severa inibição do crescimento, aumento da fase lag e redução da biomassa final. O pH inicial também influencia o consumo de açúcares e a produção de etanol, sendo que valores mais elevados (4,50–5,50) geralmente promovem maior rendimento etanólico e menor acúmulo de subprodutos, como glicerol e ácido acético.

Entretanto, nos dados obtidos a partir do crescimento em meio semissintético (YPD) observou-se que a duração da fase lag da cepa PE-2 não foi afetada pelo tratamento ácido, demonstrando a adaptação da cepa à acidificação do pH (Tabela 5).

Em relação ao teor de açúcar redutor total residual, observou-se que a condição sem tratamento ácido apresentou aumento no quinto ciclo, enquanto na condição com tratamento ácido o aumento ocorreu mais cedo. Foram detectadas diferenças estatisticamente significativas para ciclo e interação entre ciclo e tratamento, mas não houve diferença entre os tratamentos (Figura 4B; Tabela 4).

Em termos de produção de etanol, a fermentação com tratamento ácido mostrou valores iniciais superiores, com estabilização ao longo dos ciclos. Na fermentação sem tratamento ácido, as concentrações de etanol variaram ao longo dos ciclos, alcançando 6,94 g/100 mL no sexto ciclo. Na fermentação com tratamento ácido, o teor alcoólico atingiu a média de 6,97 g/100 mL no sexto ciclo. A análise estatística indicou efeitos significativos para ciclo, mas não para tratamento (Figura 4C; Tabela 4). Esses resultados sugerem adaptação da cepa PE-2 ao tratamento com ácido sulfúrico e estabilização da produção alcoólica após os ciclos iniciais.

Pereira *et al.* (2011) identificaram um limiar crítico em torno de 140 g/L de etanol, acima do qual a viabilidade de cepas industriais declina acentuadamente. Os teores alcoólicos máximos observados em nosso estudo foram de 6,94–6,97 g/100 mL, ou seja, 69,4–69,7 g/L, valores substancialmente inferiores a esse limiar. Dessa forma, embora tenha sido detectada diferença estatisticamente significativa para viabilidade (%) e para a contagem de UFC/mL em função de ciclo e de tratamento, é pouco provável que o teor de etanol isoladamente tenha provocado alterações críticas na população de *S. cerevisiae* PE-2 nas condições testadas.

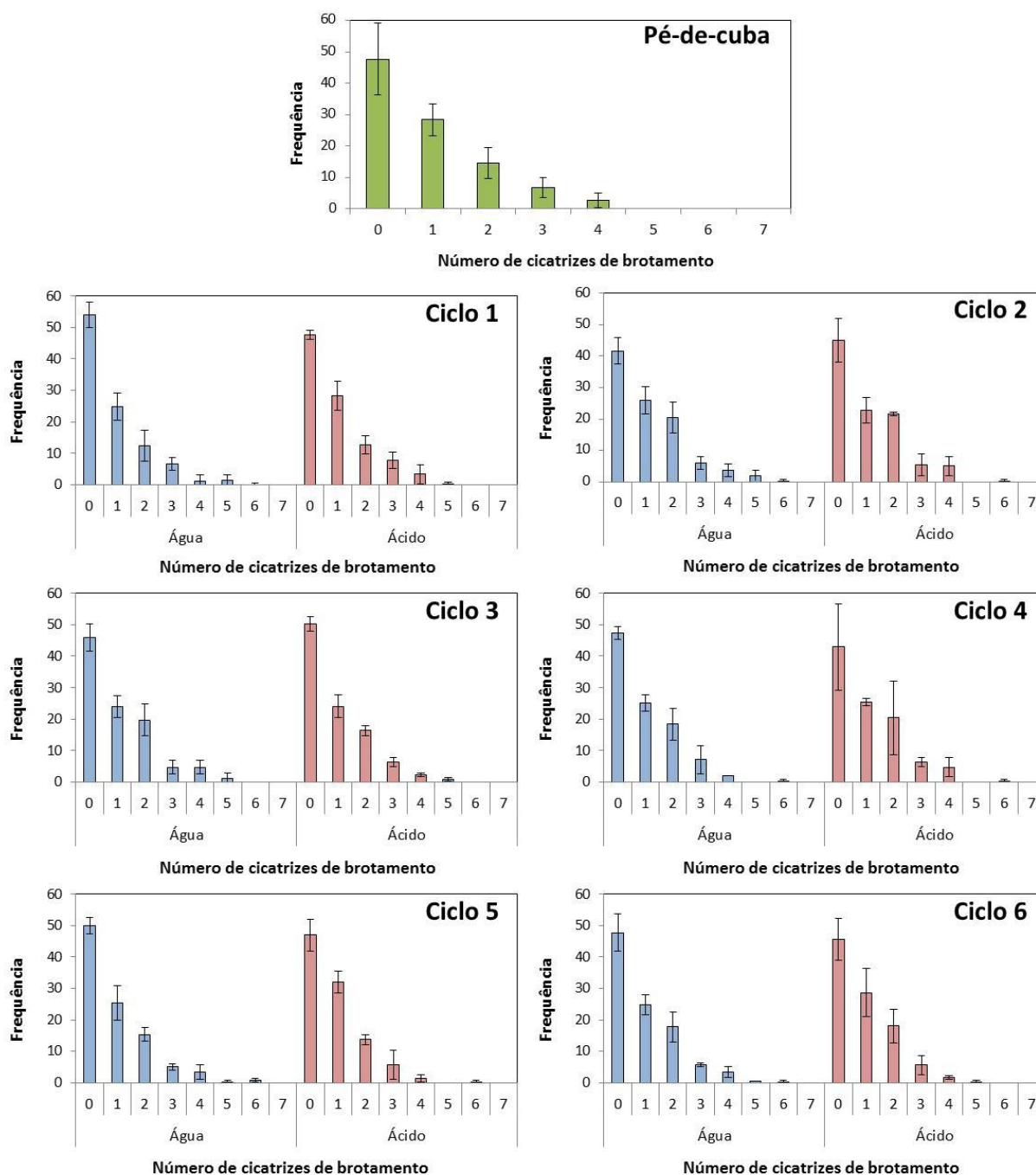
O rendimento em etanol, apesar das variações ao longo dos ciclos fermentativos, evoluiu para valores similares ao final do sexto ciclo, entre 0,45 e 0,47 g/g para fermentação sem tratamento ácido e com tratamento ácido, respectivamente. A análise estatística não identificou diferenças significativas entre ciclos, entre tratamentos e nem para a interação ciclo e tratamento (Tabela 4; Figura 4D). Embora tenham ocorrido variações significativas do teor alcoólico e da concentração de açúcares redutores totais ao longo dos ciclos fermentativos, o desempenho fermentativo da levedura não se alterou, mostrando que a linhagem industrial PE-2 é bem adaptada às condições do processo fermentativo, não sendo também impactada pelo tratamento ácido.

Os resultados da análise da frequência do número de cicatrizes de brotamento das células nas fermentações com e sem tratamento ácido estão apresentados na Figura 5. A análise estatística por Qui-quadrado mostrou não haver diferença nas frequências obtidas comparando-se os dois tratamentos (sem e com tratamento ácido) em cada ciclo fermentativo. O número de cicatrizes de brotamento é uma medida da idade da cultura de leveduras, o que indica o tempo de vida replicativa da levedura (Hagiwara *et al.*, 2011). O resultado aqui encontrado pode indicar que a idade das células nas condições sem e com tratamento ácido é praticamente a mesma, ou seja, a maioria das células tem entre 0 e 2 cicatrizes de brotamento independentemente do tratamento.

Hagiwara *et al.* (2011) discutiram a lei da conservação (*conservation law*) em leveduras que se reproduzem por brotamento (*budding yeasts*) em meio líquido, afirmando que “o tamanho da população (número total de células) é aproximadamente igual à soma total de cicatrizes de todas as células”. Depois de algumas horas de cultivo, o número de células originais se torna menor do que 0,05% do número total de células, sendo, portanto, insignificante. Assim, os autores consideram que, se muitas células ‘velhas’ morrerem na cultura, o número total de células se torna maior que o número de cicatrizes. Ao contrário, se muitas células filhas morrem, o número total de células fica menor que o número de cicatrizes. Eles estabelecem, portanto que, se a relação número médio de cicatrizes/número de células for 1, não há discrepância na lei da conservação; se for menor que 1 significa que células mais velhas morreram com mais frequência; e se for maior que 1, então são as células mais jovens que morreram.

Aplicando esse parâmetro aos resultados ‘número de cicatrizes – número de células’ para cada condição – sem tratamento e com tratamento ácido – observa-se que a média geral para a fermentação sem tratamento foi de 0,94 e para a fermentação com tratamento foi também 0,94, confirmando, portanto, que a lei da conservação se aplica à ambas as condições, ou seja, o tratamento ácido não tem influência sobre a vida replicativa da levedura.

**Figura 5.** Frequência de células em função do número de cicatrizes de brotamento da linhagem industrial PE-2 na fase de pé-de-cuba e após tratamento ácido (barra rosa) ou sem tratamento (barra azul) realizados após 6 ciclos na fermentação em batelada alimentada. Número total de células contadas=100.



Associando esse resultado aos dados obtidos para brotamento (%), parâmetro que apresentou diferença significativa entre os tratamentos (sendo maior para a condição tratamento ácido), pode-se inferir que há um estímulo ao brotamento das células devido à morte de células ocasionada pelo ácido, mas as células mortas são provavelmente células jovens, não havendo sobrevivência das células por muito tempo nas condições de

fermentação. Se isso acontecesse, o número de células com maior número de cicatrizes de brotamento seria maior.

## 5.2 Efeito do tratamento ácido sobre a levedura industrial CAT-1

Os mesmos experimentos foram realizados com a cepa CAT-1 para avaliar parâmetros de viabilidade e vitalidade a partir de indicadores microbiológicos e fermentativos. O propósito foi investigar como o tratamento com ácido sulfúrico influencia diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, permitindo discutir respostas adaptativas específicas de cada cepa e os mecanismos fisiológicos mobilizados durante a fermentação.

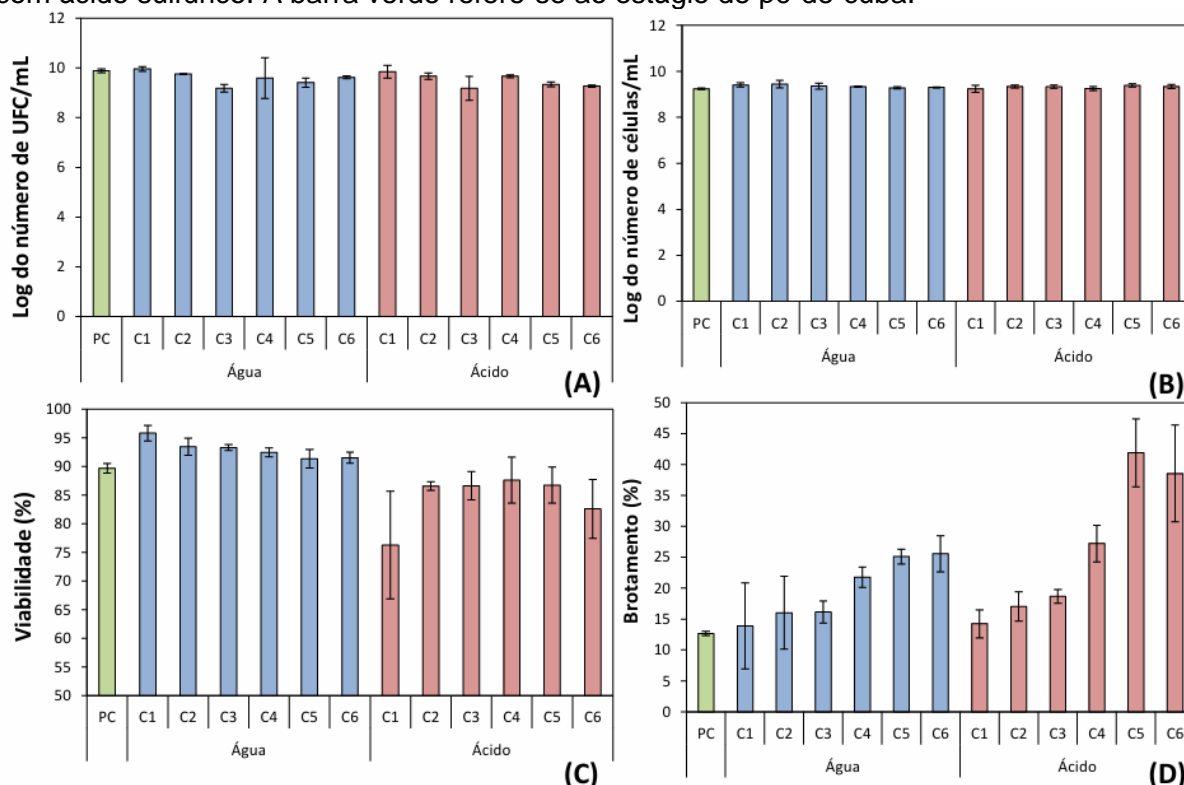
Quanto à contagem de UFC/mL, a linhagem CAT-1 apresentou valores médios de  $7,75 \times 10^9$  UFC/mL no pé de cuba. Ao final do 6.º ciclo fermentativo, observou-se uma redução para  $4,05 \times 10^9$  UFC/mL na fermentação sem tratamento ácido e  $1,76 \times 10^9$  UFC/mL na fermentação submetida ao tratamento ácido (Figura 6A). A análise estatística indicou diferença significativa entre os ciclos, mas não entre os tratamentos (Tabela 6), evidenciando que a cepa sofreu impacto ao longo dos ciclos fermentativos, reduzindo o número de UFC/mL. No entanto, o número de células viáveis/mL não apresentou variação significativa entre os ciclos ou entre os tratamentos (Figura 6B; Tabela 6).

Quanto à viabilidade celular (%), observou-se que na fermentação sem tratamento ácido, os valores iniciais foram de 89,7% no pé de cuba, atingindo 91,5% ao final do sexto ciclo. Na fermentação tratada com ácido sulfúrico, a viabilidade estabilizou-se em 82,6% no sexto ciclo. A análise estatística evidenciou diferença significativa entre os tratamentos, indicando uma redução geral da viabilidade na condição ácida em comparação à fermentação sem tratamento ácido (Figura 6C; Tabela 6). Esses resultados corroboram os achados de Della-Bianca e Gombert (2013), que destacaram a sensibilidade da linhagem industrial CAT-1 ao estresse provocado por baixos valores de pH, ressaltando que, em pH 2,5, a cepa CAT-1 não apresentou crescimento após seis dias de incubação. Os mesmos autores reforçam que a resposta da CAT-1 ao estresse ácido está associada não apenas à perda de crescimento, mas também a alterações fisiológicas que comprometem sua vitalidade. Em experimentos comparativos, CAT-1 apresentou maior redução de viabilidade do que PE-2 sob condições de 2,5, evidenciando menor capacidade de tolerância ao tratamento ácido (Della-Bianca; Gombert, 2013).

Em relação à atividade reprodutiva, a análise do percentual de brotamento revelou que a cepa CAT-1 apresentou valores médios significativamente superiores na presença do tratamento ácido, iniciando em 12,65% no pé de cuba e alcançando 38,52% no sexto ciclo fermentativo, em comparação com 25,55% na fermentação sem tratamento ácido (Figura 6D). Esses resultados indicam que o tratamento ácido estimulou a atividade celular associada ao brotamento, especialmente nos ciclos mais avançados. Além disso, a análise

estatística evidenciou diferenças significativas para os fatores ciclo, tratamento e para a interação entre ambos (Tabela 6). De forma geral, o processo fermentativo promoveu o aumento da divisão celular, sendo esse efeito potencializado pela aplicação do tratamento ácido.

**Figura 6.** Log do número de UFC/mL, log do número de células/mL, viabilidade celular (%) e taxa de brotamento (%) da linhagem industrial CAT-1 ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico. A barra verde refere-se ao estágio de pé-de-cuba.



O índice de brotamento (*budding index*, BI) quantifica a fração de células em divisão e funciona como um marcador direto da atividade reprodutiva da população. A medição em tempo real do BI permite detectar alterações na dinâmica celular que não são imediatamente evidentes por contagens totais ou CFU (Marbà-Ardébol *et al.*, 2018). Esses autores demonstraram que o BI se correlaciona fortemente com a taxa de crescimento e varia conforme as fases do cultivo; picos de BI ocorrem na adaptação/início do crescimento e declinam quando a população aumenta em quantidade de células em estágio reprodutivo. Assim, um aumento do BI em CAT-1 sob tratamento ácido pode indicar alteração da heterogeneidade populacional (seleção ou ativação de subpopulações reprodutivamente ativas) e/ou mudanças no estágio do ciclo celular que acompanham o estresse aplicado (Marbà-Ardébol *et al.*, 2018).

**Tabela 6.** Resultado da análise estatística das variáveis/parâmetros analisados durante fermentação em batelada alimentada com reciclo celular (seis ciclos fermentativos) da levedura industrial CAT-1 em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).

Parâmetro	Two-way anova		
	Tratamento	Ciclo	Interação
Log número células/mL	n.s	n.s	n.s
Log número UFC/mL	n.s	*	n.s
Brotamento (%)	*	*	*
Viabilidade (%)	*	n.s	n.s
Teor alcoólico (g/100 mL)	*	*	*
Açúcar redutor total residual (g/100 mL)	*	*	*
pH final	*	*	*
Rendimento (g etanol/g açúcar redutor total)	*	*	n.s

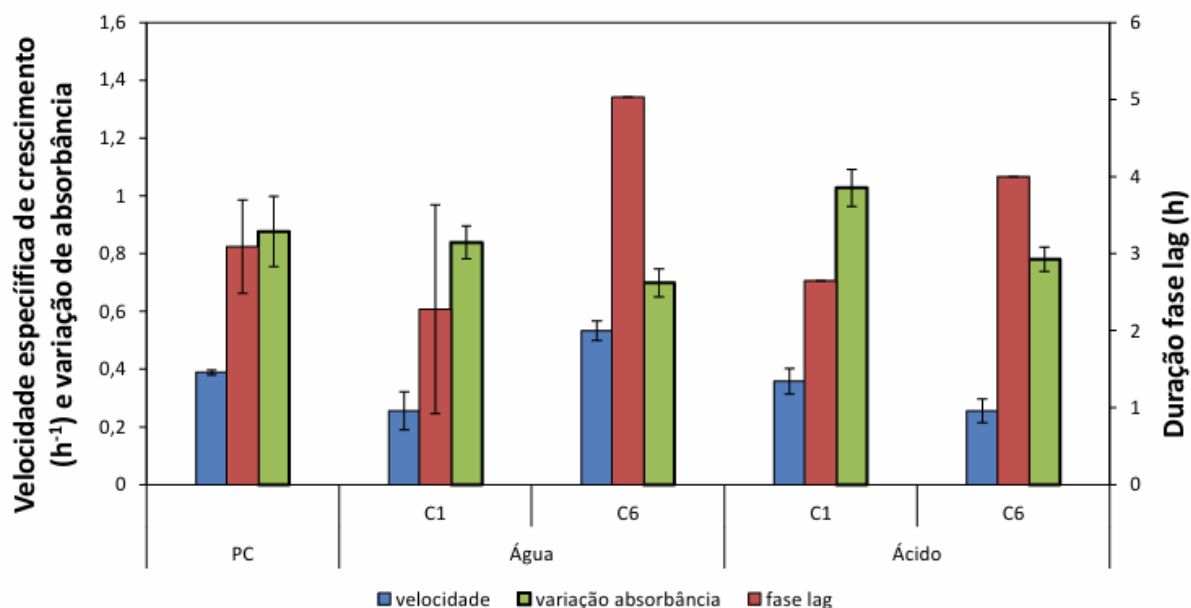
n.s.= não significativo ( $p > 0,05$ ); \*= significativo a 5% ( $p < 0,05$ )

Os parâmetros de crescimento da cepa CAT-1 em meio líquido estão apresentados na Figura 7, incluindo a velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ), a variação da absorbância e a duração da fase lag. A análise estatística revelou que a velocidade específica máxima de crescimento apresentou diferenças significativas para ciclo, tratamento e interação entre ciclo e tratamento (Tabela 7). Na fermentação sem tratamento ácido, a velocidade aumentou progressivamente do pé de cuba até o sexto ciclo. Em contraste, na presença do ácido, observou-se uma redução da velocidade de crescimento, resultando em valores inferiores aos observados no pé de cuba.

Especificamente quanto à duração da fase lag, houve diferença significativa entre ciclos, com redução média dos valores encontrados no pé-de-cuba para o primeiro ciclo fermentativo e aumento no sexto ciclo, tanto na fermentação sem quanto na fermentação com tratamento ácido. Já a variação da absorbância apresentou diferença significativa para ciclo e tratamento, demonstrando aumento no primeiro ciclo na presença do ácido e redução ao final do sexto ciclo em ambas as condições.

Em particular, a redução significativa da velocidade de crescimento na presença de ácido sugere que o tratamento induz mecanismos de adaptação ou tolerância que modulam o crescimento celular. Além disso, a interação significativa entre tratamento e ciclo observada na variação de absorbância indica que a resposta da cepa CAT-1 ao ácido, bem como seu comportamento de crescimento, varia ao longo dos ciclos fermentativos, refletindo ajustes fisiológicos frente ao estresse imposto pelo processo.

**Figura 7.** Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ), variação de absorbância e duração da fase lag (h) da linhagem industrial CAT-1 no estágio de pé-de-cuba (PC) e ao final dos ciclos 1 e 6 (C1 e C6) na fermentação em batelada alimentada.



**Tabela 7.** Resultado da análise estatística dos parâmetros analisados quanto ao crescimento em meio semissintético (YPD) das células da linhagem industrial CAT-1 amostradas da fermentação em batelada alimentada com reciclo celular, após os ciclos fermentativos 1 e 6, em caldo de cana submetida a dois tratamentos celulares (água; ácido sulfúrico, pH 2,5).

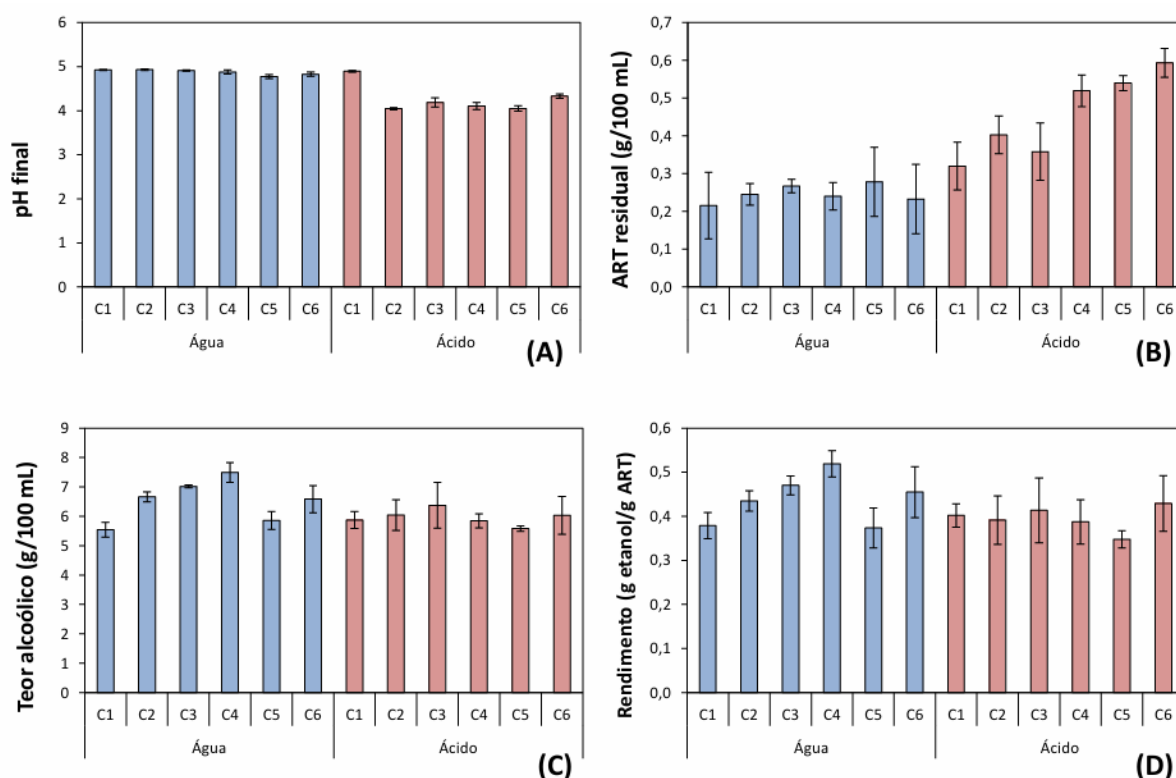
Parâmetro	Two-way anova		
	Tratamento	Ciclo	Interação
Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ )	*	*	*
Duração da fase lag (h)	n.s	*	n.s
Variação de absorbância	*	*	n.s

n.s.= não significativo ( $p>0,05$ ); \*= significativo a 5% ( $p<0,05$ )

Na Figura 8 são apresentados os resultados de teor alcoólico, açúcares redutores totais residuais, pH final e rendimento. Em relação ao pH (Figura 8A), foi observada diferença significativa entre ciclos e tratamentos, com interação significativa entre ciclo e tratamento (Tabela 6). A queda observada no pH final na fermentação com tratamento ácido era esperada, refletindo o efeito do procedimento de acidificação sobre o mosto. Assim como discutido para a linhagem PE-2, dois fatores principais explicam essa redução: a liberação de  $CO_2$  durante a fermentação, que ao reagir com a água forma ácido carbônico e reduz o pH à medida que os ciclos avançam; e o ajuste da solução de tratamento com ácido

sulfúrico para pH 2,5, seguido da alimentação com caldo de cana diretamente sobre essa solução, intensificando a queda de pH na fermentação com tratamento ácido.

**Figura 8.** pH final, concentração de açúcar redutor total residual (ART em g/100 mL), teor alcoólico (g/100 mL) e rendimento (g etanol/g açúcar) ao longo dos ciclos celulares (C1 a C6) na fermentação em batelada alimentada com a linhagem industrial CAT-1, com (barra rosa) e sem tratamento (barra azul) com ácido sulfúrico.



Em relação aos açúcares redutores totais residuais (Figura 8B), observou-se aumento na quantidade de açúcares remanescentes até o terceiro ciclo, seguido de queda e posterior elevação até o sexto ciclo na fermentação sem tratamento ácido. Na fermentação tratada com ácido sulfúrico, verificou-se um aumento gradual dos açúcares residuais ao longo dos ciclos, alcançando uma média de 0,59 g/100 mL no sexto ciclo, em comparação com 0,23 g/100 mL na fermentação sem tratamento (Figura 8B). Foi detectada diferença estatisticamente significativa para ciclo, tratamento e interação entre ciclo e tratamento, indicando que a cepa CAT-1 apresenta redução na utilização do substrato à medida que a fermentação avança, especialmente sob efeito do tratamento ácido.

Segundo Della-Bianca e Gombert (2013), linhagens industriais como a CAT-1 apresentam queda de rendimento em condições de baixo pH. O estudo demonstra que, embora mantenha atividade fermentativa, há prejuízo no aproveitamento do substrato e no rendimento alcoólico, sobretudo em cenários que simulam o ambiente industrial de ciclos sucessivos.

O teor alcoólico (g/100 mL) apresentou comportamento distinto entre os tratamentos. Na fermentação sem tratamento ácido observou-se aumento do primeiro até o quarto ciclo, atingindo 7,49 g/100 mL; houve queda no quinto ciclo e o sexto finalizou em 6,58 g/100 mL. Na fermentação com tratamento ácido o pico ocorreu mais cedo, no terceiro ciclo, com 6,37 g/100 mL, valor inferior ao observado na fermentação sem tratamento ácido, e encerrou o sexto ciclo em 6,06 g/100 mL. A análise estatística indicou variação significativa em função de ciclo e de tratamento, além de interação entre ciclo e tratamento (Figura 8C; Tabela 6). Esses resultados sugerem que o tratamento com ácido sulfúrico afetou a capacidade da cepa CAT-1 de produzir etanol sob as condições testadas.

O rendimento em etanol, expresso em gramas de etanol por grama de açúcar redutor total (g etanol/g ART), apresentou comportamento distinto entre os tratamentos. Ao longo dos ciclos de fermentação, a condição sem tratamento mostrou melhor resultado nos ciclos intermediários, atingindo pico de 0,51 g/g no quarto ciclo e finalizando o sexto ciclo em 0,45 g/g. A fermentação tratada com ácido apresentou rendimento menor na fase final, com média de 0,42 g etanol/g no sexto ciclo. A análise estatística indicou diferença significativa em função de ciclo e de tratamento (Figura 8D; Tabela 6).

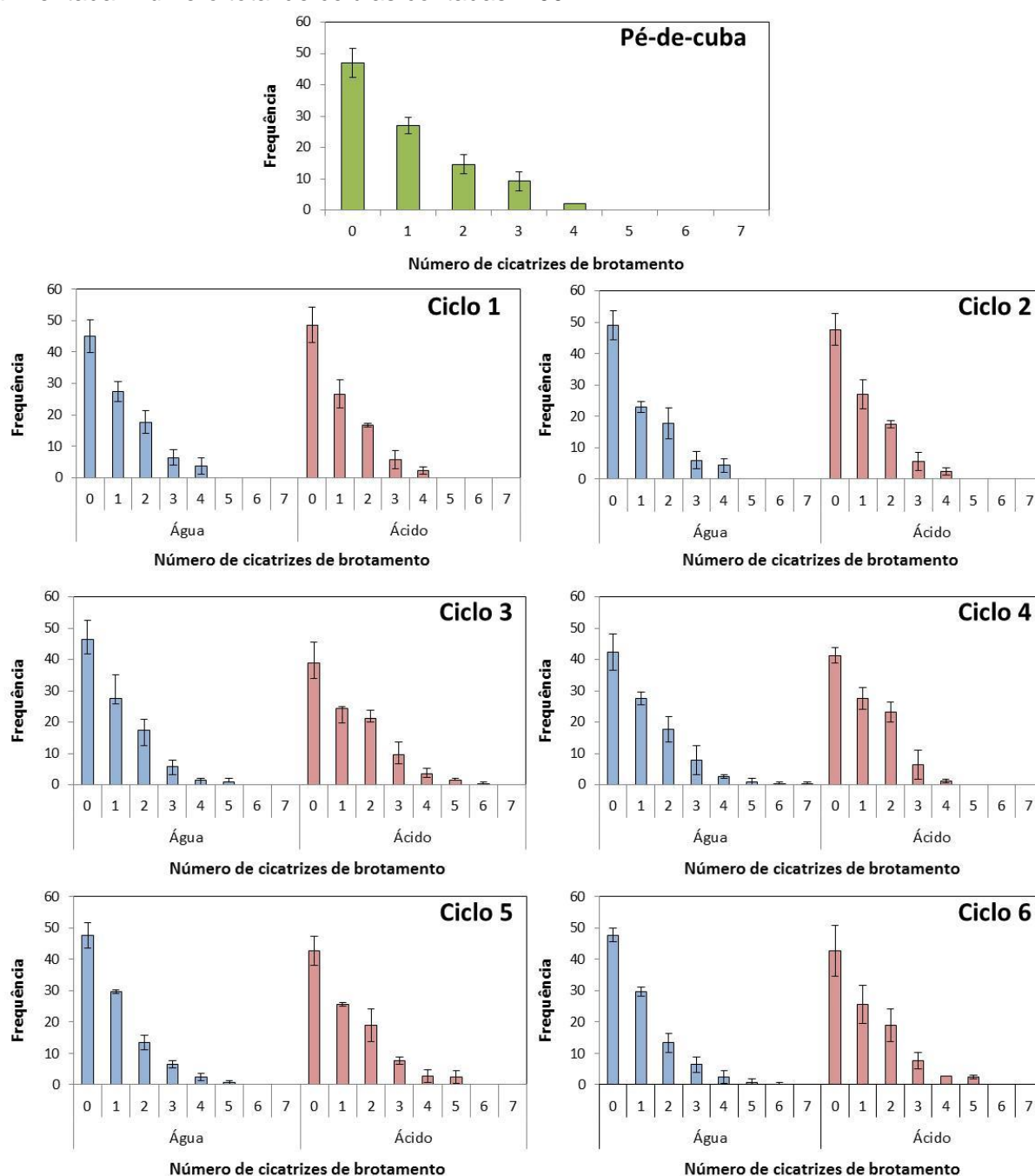
Os resultados da análise da frequência do número de cicatrizes de brotamento das células nas fermentações com e sem tratamento ácido estão apresentados na Figura 9. A análise estatística por Qui-quadrado mostrou não haver diferença nas frequências obtidas comparando-se os dois tratamentos (sem e com tratamento ácido) em cada ciclo fermentativo. O resultado aqui encontrado pode indicar que a idade das células nas condições sem e com tratamento ácido é praticamente a mesma, ou seja, a maioria das células tem entre 0 e 2 cicatrizes de brotamento independentemente do tratamento.

Aplicando o parâmetro proposto por Hagiwara *et al.* (2011), conforme descrito no item anterior para a linhagem PE-2, aos resultados 'número de cicatrizes – número de células' para cada condição – sem tratamento e com tratamento ácido – observa-se que a média geral para a fermentação sem tratamento foi de 0,96 e para a fermentação com tratamento foi 0,98, confirmando portanto que a lei da conservação se aplica à ambas as condições, ou seja, o tratamento ácido não tem influência sobre a vida replicativa da levedura.

Associando esse resultado aos dados obtidos para brotamento (%), parâmetro que apresentou diferença significativa entre os tratamentos (sendo maior para a condição tratamento ácido), a mesma explicação dada à linhagem PE-2 aplica-se à linhagem CAT-1, ou seja, pode-se inferir que há um estímulo ao brotamento das células devido à morte de células ocasionada pelo ácido, mas as células mortas são provavelmente células jovens, não havendo sobrevivência das células por muito tempo nas condições de fermentação. Se

isso acontecesse, o número de células com maior número de cicatrizes de brotamento seria maior.

**Figura 9.** Frequência de células em função do número de cicatrizes de brotamento da linhagem industrial CAT-1 na fase de pé-de-cuba e após tratamento ácido (barra rosa) ou sem tratamento (barra azul) realizados após 6 ciclos na fermentação em batelada alimentada. Número total de células contadas=100.



### 5.3 Análise comparativa do efeito do tratamento ácido sobre as linhagens industriais PE-2 e CAT-1

As linhagens industriais CAT-1 e PE-2 compartilham características favoráveis no ambiente fermentativo que propiciam sua ampla utilização no cenário brasileiro e internacional, dentre elas alta adaptabilidade, alto rendimento fermentativo e dominância perante demais cepas ao final de cada ciclo (Basso *et al.*, 2008).

Dessa forma, a comparação das análises deste estudo contribui para elucidar as diferenças presentes em ambas as cepas quanto aos efeitos causados sobre a vitalidade e a viabilidade celular na presença do tratamento com ácido sulfúrico.

Babrzadeh *et al.* (2012) analisaram a proximidade genômica entre as linhagens CAT-1 e JAY299, uma linhagem derivada haploide da linhagem PE-2, por meio da análise do número de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Os autores relataram que, ao analisar os genes *IRA1* e *IRA2*, verificaram diversas mutações que devem ter ocorrido durante a evolução dessas cepas. Embora tenham encontrado proximidade genética para o gene *IRA2*, não foi encontrada alta proximidade genética para o gene *IRA1* entre as linhagens. Ambos os genes foram associados à resposta ao estresse ambiental e possuem funções específicas em relação um ao outro.

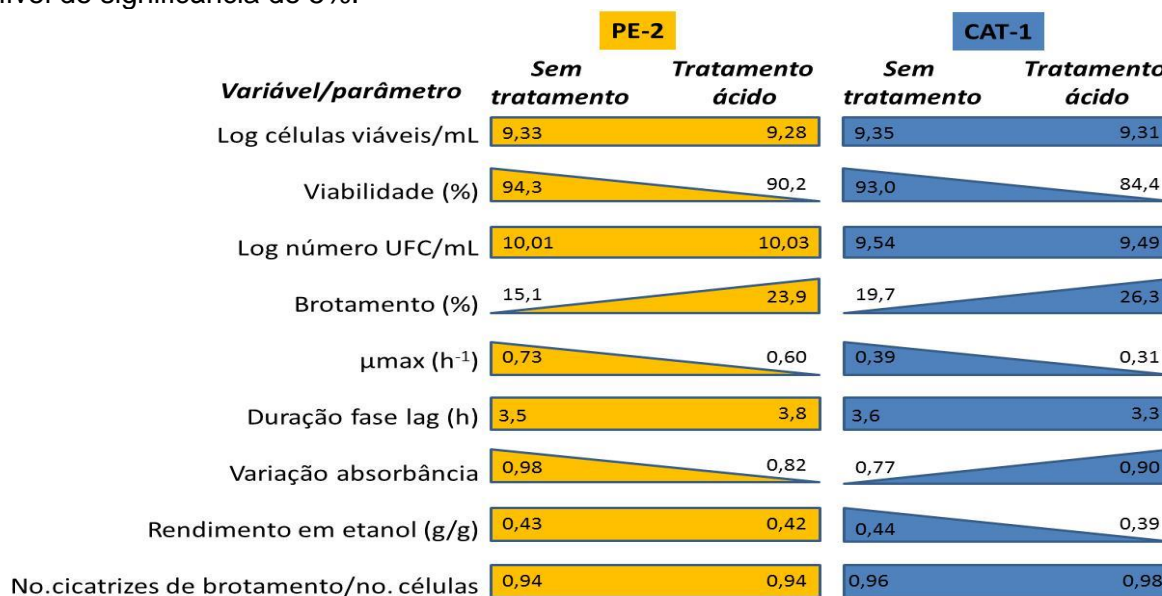
A Figura 10 traz uma representação na forma resumida de todos os resultados obtidos com as duas linhagens industriais de *S. cerevisiae*, evidenciando as médias gerais calculadas para as duas condições de tratamento (sem e com tratamento ácido) com os resultados das análises estatísticas.

Independentemente de apresentarem pontos de proximidade genética, as cepas manifestaram respostas distintas ao tratamento celular com ácido sulfúrico e aos ciclos celulares. Quanto à linhagem PE-2, esta apresentou variações significativas entre os ciclos fermentativos para diversos parâmetros/variáveis, como o número de UFC/mL, viabilidade, brotamento, teor alcoólico, pH final, açúcar redutor total residual e variação de absorvância no teste de crescimento em meio líquido (Tabela 4). Entre os tratamentos (com e sem ácido sulfúrico), observou-se diferença significativa para brotamento, viabilidade e variação de absorvância (Figura 10). Contudo, essa linhagem industrial não demonstrou alterações significativas no teor alcoólico e no consumo de açúcares redutores totais em relação ao tratamento com ácido sulfúrico, sugerindo que a sua atividade metabólica foi relativamente estável independentemente do uso do ácido sulfúrico no tratamento celular. O rendimento em etanol foi igual no sexto ciclo em ambas as fermentações, demonstrando que esta cepa se mostra adaptada ao tratamento (Figura 10).

Em comparação, a linhagem CAT-1 apresentou respostas mais pronunciadas aos ciclos fermentativos e aos tratamentos, com diferenças significativas para ciclo em parâmetros como o número de UFC/mL, brotamento, teor alcoólico, teor de açúcar redutor

total residual, pH, rendimento, velocidade específica de crescimento e variação de absorbância (Tabela 6). Já para tratamento, essa linhagem apresentou diferença estatística para brotamento, viabilidade, rendimento, velocidade específica de crescimento e variação da absorbância (Figura 10) sugerindo que a linhagem CAT-1 foi mais sensível aos fatores de estresse induzidos pelo tratamento ácido e potencializados pelo reciclo celular (Tabela 6). Essa maior sensibilidade pode estar relacionada às diferenças fenotípicas entre as linhagens industriais de *S. cerevisiae*, como evidenciado por Reis *et al.* (2017).

**Figura 10.** Representação resumida dos resultados obtidos neste estudo com as linhagens PE-2 e CAT-1 nas fermentações em batelada alimentada com reciclo celular com e sem tratamento ácido, em caldo de cana. Os retângulos indicam não haver diferença significativa entre as médias (considerando a média geral de todos os ciclos) enquanto os triângulos apontam diferença significativa entre as médias, separadamente para cada linhagem, ao nível de significância de 5%.



Brown *et al.* (2013) investigaram a resposta transcricional das cepas CAT-1 e PE-2 após o 2º ciclo fermentativo, identificando que a CAT-1 apresentou uma resposta transcricional mais intensa do que a PE-2 às mudanças ocorridas ao longo dos ciclos de fermentação. Esse padrão foi evidenciado pela maior indução de genes relacionados à produção de energia, glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, cadeia transportadora de elétrons, fermentação e respiração aeróbia. Além disso, observou-se uma repressão gênica mais pronunciada na síntese de proteínas e em múltiplos genes associados à resposta ao estresse ambiental no final da fermentação, refletindo os desafios enfrentados pelas células durante a lavagem ácida e o estresse osmótico no início de cada ciclo fermentativo.

Um aspecto relevante a ser considerado refere-se ao rendimento fermentativo e ao teor de açúcar redutor total residual ao final da fermentação de cada cepa. Em ambos os

casos, observou-se sobra de açúcar ao final de cada ciclo fermentativo, acompanhada de queda no rendimento durante os ciclos intermediários avaliados (entre o 3.<sup>o</sup> e o 4.<sup>o</sup> ciclo, em ambos os cenários). Nesse contexto, análises complementares de liberação de CO<sub>2</sub> e de quantificação de carboidratos intracelulares são ferramentas úteis para elucidar o destino do substrato consumido. A literatura aponta que o acúmulo de carboidratos de reserva, como glicogênio e trealose está fortemente associado à manutenção da viabilidade celular, ao passo que a liberação de CO<sub>2</sub> é um bom indicador da velocidade fermentativa e da adaptação da cepa às condições industriais. Entretanto, Raghavendran *et al.* (2017) destacam que taxas reduzidas de desprendimento de CO<sub>2</sub> não implicam necessariamente em menor capacidade fermentativa. Em muitos casos, parte do carbono do mosto é desviada para a biossíntese de carboidratos de reserva, que além de funcionarem como importantes fontes de energia conferem maior tolerância celular ao estresse. Assim, o perfil de desprendimento de CO<sub>2</sub> pode se apresentar atenuado sem que isso comprometa o desempenho fermentativo ou a adaptação da levedura ao ambiente industrial.

Essa observação está de acordo com Basso *et al.* (2015), que indicam que leveduras industriais, como a PE-2, tendem a acumular maiores quantidades de trealose e glicogênio em comparação com leveduras não industriais. Esse acúmulo de carboidratos de reserva é uma característica adaptativa importante para processos industriais contínuos, onde a capacidade de tolerância ao estresse é crucial para a manutenção da viabilidade celular e para a eficiência do processo fermentativo ao longo do tempo (Trevisol *et al.*, 2011).

Os estudos de Santos *et al.* (2017) fornecem uma perspectiva adicional. A linhagem CAT-1 destacou-se por apresentar níveis aumentados de proteínas do complexo de síntese de trealose, como Tps1, Tps2 e Tps3, tornando-a mais eficiente no acúmulo dessa molécula. Além disso, a CAT-1 exibiu níveis elevados de proteínas como Ssa1, Hsp104 e Hsp26, que estão associadas à proteção contra o estresse, à prevenção da agregação de proteínas e à promoção da longevidade celular. Entretanto, os autores relataram que tais genes, ao comparar as cepas industriais CAT-1 e PE-2, são mais abundantes em CAT-1 do que na cepa PE-2 após o 1<sup>o</sup> ciclo fermentativo.

Trealose e glicogênio são os principais carboidratos de reserva de *S. cerevisiae*, representando parcela significativa da matéria seca da levedura (Ferreira; Amorim; Basso, 1999). Como dito anteriormente, a cepa PE-2 acumula mais trealose e glicogênio que leveduras de panificação. Além disso, esses carboidratos de reserva influenciam na viabilidade da levedura, apresentando uma queda drástica da viabilidade quando os níveis de trealose estão abaixo de limites críticos, enquanto maiores níveis de trealose contribuem para a tolerância ao estresse durante os reciclos (Basso *et al.*, 2008). Na fisiologia da levedura, o glicogênio acumula-se mediante a presença de glicose no meio, enquanto a trealose acumula-se somente após a exaustão da glicose (Françóis; Walther; Parrou, 2011).

Entretanto, os dados de concentração de açúcar redutor residual e rendimento fermentativo demonstraram a presença de açúcar ao final de cada ciclo fermentativo (ao redor de 4 g/L), ressaltando que o meio fermentativo não estaria com escassez de carboidratos.

O glicogênio exerce efeito diminuto sobre a pressão osmótica interna da célula, resultando em vantagem em meios com deficiência nutricional, enquanto a trealose atua sobre a estabilidade da estrutura da bicamada lipídica da membrana celular e das proteínas, evitando a agregação de proteínas e mudanças químicas em moléculas orgânicas (Eleutherio *et al.*, 2015; Singer; Lindquist, 1998). Tais características fisiológicas acarretam impactos diretos na fisiologia e, conseqüentemente, causariam efeitos sobre a fermentação e a produção de etanol.

Na indústria brasileira de etanol, os valores usuais variam entre 7 e 12% (v/v) (Brexó; Sant'Ana, 2017). Nos experimentos conduzidos, os teores alcoólicos médios ao final de seis ciclos foram de 6,47 g/100 mL (8,19% v/v) na condição sem tratamento e 6,51 g/100 mL (8,24% v/v) com tratamento ácido para a linhagem PE-2. Já a linhagem CAT-1 apresentou médias de 6,53 g/100 mL (8,27% v/v, sem tratamento) e 5,96 g/100 mL (7,54% v/v, com tratamento ácido). Em termos práticos, o impacto do tratamento ácido foi mais evidente em CAT-1 do que em PE-2.

Quanto ao rendimento, a linhagem PE-2 apresentou médias de 0,43 g/g (sem tratamento) e 0,42 g/g (com tratamento), valores bastante próximos entre si. Por outro lado, para a linhagem CAT-1, os rendimentos foram de 0,44 g/g (sem tratamento) e 0,39 g/g (com tratamento), indicando redução mais expressiva sob a condição de tratamento ácido.

Os dados mostram que para a linhagem PE-2, os ciclos celulares implicaram perda parcial de células, indicada pela redução estatisticamente significativa da viabilidade percentual ao longo dos ciclos (Tabela 4). Contudo, a densidade de células viáveis/mL, estimada por contagem microscópica (log células/mL), manteve-se sem variação significativa. Concomitantemente, observou-se aumento do percentual de brotamento com o avanço dos ciclos, o que sugere que a ativação do processo de brotamento compensou em parte a perda de viabilidade, resultando em uma população cultivável relativamente estável. Em consequência, essa dinâmica não pareceu comprometer a capacidade fermentativa da levedura, que registrou elevação do teor alcoólico e do rendimento nos ciclos intermediários (ciclos dois e três), independentemente da aplicação do tratamento ácido.

Essas diferenças foram suportadas pela análise estatística, indicando efeito de ciclo e de tratamento sobre os parâmetros fermentativos e sugerem que a capacidade de conversão de substrato em etanol pela CAT-1 foi mais sensível ao tratamento ácido do que a observada para PE-2.

No que tange à dinâmica populacional, os dados mostram impacto relevante do tratamento sobre a culturabilidade e a vitalidade da CAT-1. As contagens de UFC/mL

diminuíram do pé de cuba de  $7,75 \times 10^9$  UFC/mL para  $4,05 \times 10^9$  UFC/mL no 6.º ciclo em controle e para  $1,76 \times 10^9$  UFC/mL na condição sem tratamento (Figura 7A), evidenciando perda progressiva de unidades formadoras de colônia, especialmente com o tratamento ácido. A contagem microscópica do número de células por mL, por sua vez, não variou significativamente, enquanto a viabilidade percentual foi consistentemente menor na condição com tratamento ácido (iniciando em 76,3% e estabilizando em 82,6% no ciclo 6 contra 89,7% para 91,5% na fermentação sem tratamento). O percentual de brotamento aumentou de forma mais pronunciada na presença do ácido (12,65% para 38,52%), indicando maior estímulo à divisão celular em subpopulações capazes de brotar, mesmo com redução da culturabilidade.

Em conjunto, o padrão de aumento do açúcar residual — notadamente maior na condição com tratamento ácido, alcançando 0,59 g/100 mL no ciclo 6 versus 0,23 g/100 mL sem tratamento — associado à queda do rendimento e à redução da velocidade específica máxima de crescimento sob efeito do ácido, sugere que parte do carbono não foi convertida em etanol. Possíveis explicações incluem redução da atividade fermentativa por dano fisiológico, desvio de carbono para síntese de carboidratos de reserva ou competição/efeitos de coestressores; todavia, a confirmação desses mecanismos exige medidas complementares, como quantificação de glicogênio e trealose, perfil de açúcares por HPLC e mensuração de ATP intracelular.

Os resultados das contagens de cicatrizes de brotamento com as duas linhagens mostraram que não houve diferença quanto à idade das células nas duas situações de tratamento celular (com e sem tratamento ácido) após os ciclos fermentativos, de forma que a hipótese normalmente apresentada de que o tratamento ácido mata as células senescentes mantendo a população mais jovem e, portanto, mais fisiologicamente ativa (Gomes *et al.*, 2016; Oliva-Neto *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2011), parece não ser suportada pelos resultados aqui apresentados. O padrão de frequência de células em função do número de cicatrizes de brotamento é o mesmo desde a fase de pé-de-cuba, não variando entre os ciclos e entre os tratamentos. Desde a fase de propagação das células, essas apresentaram poucas cicatrizes de brotamento (a maioria até 2-3 cicatrizes). Porém, foi significativa a queda de viabilidade com o tratamento ácido para ambas as linhagens ao mesmo tempo que o número de células viáveis não se alterou significativamente. Esse resultado mostra que ocorre morte de células por ação do ácido, induzindo o aumento significativo no percentual de brotamento para produção de novas células e mantendo assim o número total de células constante. Porém as células que morrem são células jovens, de forma que uma célula não vive por muito tempo no ambiente fermentativo. Essa é uma hipótese que merece ser comprovada com outras técnicas que permitam seguir o curso de vida das células individualmente.

## 6 CONCLUSÃO

O tratamento com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ , pH 2,5; 2 h) aplicado ao final de cada ciclo afetou tanto a viabilidade quanto a vitalidade de *Saccharomyces cerevisiae*, de maneira dependente da linhagem. Na linhagem PE-2, o tratamento induziu redução da viabilidade (%), aumento do brotamento (%), queda da velocidade específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ,  $h^{-1}$ ) e alteração da variação de absorvância, indicando impacto sobre a vitalidade e a viabilidade da população. Não obstante, a capacidade fermentativa da PE-2 foi preservada ao longo dos seis ciclos: não se verificou comprometimento significativo no teor alcoólico (g / 100 mL) nem no rendimento (g etanol / g açúcares), caracterizando um perfil de robustez funcional em que a redução parcial de marcadores celulares não se traduz em perda de eficiência de conversão.

Em contraste, a linhagem CAT-1 demonstrou maior sensibilidade ao tratamento ácido. Observou-se aumento do brotamento (%), acompanhado de redução do teor alcoólico (g / 100 mL), acúmulo de açúcares redutores residuais (g / 100 mL) e queda do rendimento (g etanol / g açúcares). Esses achados indicam que, sob estresse ácido, CAT-1 mobiliza estratégias de divisão e sobrevivência em detrimento da eficiência fermentativa, resultando em menor consumo de substrato e perda de rendimento.

A análise das cicatrizes de brotamento (número de cicatrizes / número de célula) forneceu evidências convergentes em ambas as cepas: houve indícios de seleção de subpopulações metabolicamente ativas concomitante à morte de células de maneira prévia ao acúmulo de características correlacionadas a senescência, sugerindo redução da longevidade da população sob ciclos sucessivos de estresse.

Dessa forma, o tratamento celular com ácido sulfúrico mantém-se como uma opção tecnicamente viável e amplamente empregada para o controle bacteriano no contexto industrial, sem evidências de comprometimento da vida reprodutiva das linhagens de *S. cerevisiae* avaliadas nas condições estudadas. A análise das cicatrizes de brotamento indicou que o tratamento ácido não afetou a longevidade da levedura, sendo um fator atrelado à própria fermentação. Embora tenham sido observados efeitos negativos pontuais sobre viabilidade e vitalidade, especialmente dependentes da linhagem, tais alterações não se refletiram necessariamente em perdas de desempenho fermentativo. Na linhagem PE-2, em particular, o rendimento e o teor alcoólico foram mantidos ao longo dos ciclos, evidenciando que a exposição ao ácido sulfúrico pode ser compatível com elevada eficiência de conversão. Esses resultados reforçam que o tratamento ácido, quando adequadamente conduzido, concilia controle microbiano com preservação da dinâmica populacional e do rendimento fermentativo, devendo sua aplicação considerar a resposta específica de cada linhagem industrial.

## 7 LITERATURA CITADA

- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. *In*: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, A. G. D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, p. 39-46, 2009.
- AMORIM, H. V.; GRYSCHKEK, M.; LOPES, M. L. The success and sustainability of the Brazilian sugarcane–fuel ethanol industry. *In*: EGGLESTON, G. (ed.) **Sustainability of the sugar and sugar ethanol industries**. Washington: American Chemical Society. v. 1058, p.73–82, 2010.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- BACON, J. S.; DAVIDSON, E. D.; JONES, D.; TAYLOR, I. F. The location of chitin in the yeast cell wall. **Biochemical journal**, v. 101, n. 2, p. 36C, 1966.
- BATISTOTE, M.; CARDOSO. A. C.; ERNANDES. J. R.; DOFFINGER, R. D. Desempenho de leveduras obtidas em indústria do Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de caldo de cana. **Revista Ciência e Natura**, v. 32, p. 83-95, 2010.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. *In*: SANTOS BERNARDES, M. A. (ed). **Biofuel production recent developments and prospects**. Croatia: Intech, p.85-100, 2011.
- BABRZADEH, F.; JALILI, ROXANA.; WANG, C.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S.; ROBINSON-MOSHER, A.; NYREN, P.; SHAFER, R. W.; L. C. BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. DAVIS, R. W.; RONAGHI, M.; B GHARIZADEH, B.; STAMBUK, B. U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287, p. 485-494, 2012.
- BAYROCK, D. P; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.
- BISCHOFF, K. M.; LIU, S.; LEATHERS, T. D.; WORTHINGTON, R. E.; RICH, J. O. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 117-122, 2009.

- BOUIX, M.; GHORBAL, S.; PICQUE, D.; PERRET, B.; SAULOU-BÉRION, C. A rapid method for the assessment of the vitality of microorganisms using flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 101, n. 7, p. 577-587, 2022.
- BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423-434, 2017.
- BROWN, N.A.; CASTRO, P.A.; FIGUEIREDO, B.C.P.; SAVOLD, M.; BUCKERIDGE, M.S.; LOPES, M.L.; PAULLILO, S.C.L.; BORGES, E.P.; AMORIM, H.V.; GOLDMAN, M.H.S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G.H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 277-290, 2013.
- BURTNER, C.; MURAKAMI, C. J.; KENNEDY, B. K.; KAEBERLEIN, M. A. A molecular mechanism of chronological aging in yeast. **Cell Cycle**, v. 8, n. 8, p. 1256-1270, 2009.
- CABIB, E.; DRGON, T.; DRGONOVA, J.; FORD, R. A.; KOLLAR, R. The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, n. 1, p. 200-204, 1997.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação etanólica**: fundamentos, avanços e perspectivas. 1. ed. São Carlos: EDUFSCar, 2021.
- COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 77-85, 2018.
- DELLA-BIANCA, B. E.; GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 1083-1095, 2013.
- DELLA-BIANCA, B. E.; HULSTER, E.; PRONK, J. T.; VAN-MARIS, A. J.; GOMBERT, A. K. Physiology of the fuel ethanol strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 at low pH indicates a context-dependent performance relevant for industrial applications. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 8, p. 1196-1205, 2014.
- EIGENFELD, M.; KERPES, R.; BECKER, T. Understanding the impact of industrial stress conditions on replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 2, 665490, 2021.
- EIGENFELD, M.; WITTMANN, L.; KERPES, R.; SCHAWAMINGER, S.; BECKER, T. Quantification methods of determining brewer's and pharmaceutical yeast cell viability: accuracy and impact of nanoparticles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 415, p. 3201-3213, 2023.

- ELEUTHERIO, E.; PANEK, A.; MESQUITA, J. F.; TREVISOL, E.; MAGALHÃES, R.  
Revisiting yeast trehalose metabolism. **Current Genetics**, v. 61, p. 263-274, 2015.
- FEIZI, A.; YIBO, Z.; ALON, G.; ALEX, G.; MICHELLE, L., RAYMOND, Y. L. C.; BRANDON B.; HAYDAR O.; WEI L.; MICHAEL W.; YICHEN W.; AYDOGAN, O. Rapid, portable and cost-effective yeast cell viability and concentration analysis using lensfree on-chip microscopy and machine learning. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 22, p. 4350-4358, 2016.
- FRANÇOIS, J. M.; WALTHER, T.; PARROU, J. L. Genetics and regulation of glycogen and trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: LIU, Z. L. (ed). **Microbial stress tolerance for biofuels: systems biology**. Berlin: Springer, 2011. p. 29-55.
- GABRIEL, P.; DIENSTBIER, M.; MATOULKOVÁ, D; KOSAR, K.; SIGLER, K.. Optimised acidification power test of yeast vitality and its use in brewing practice. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 3, p. 270-276, 2008.
- GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1989. 388 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 1990.
- GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International Sugar Journal**, v. 110, p. 175–181, 2008.
- GOMES, A. D.; PEREIRA, A. A.; MARINI, D. C.; ZUIM, N. R. B. Análise de acidez, cobre e graduação alcoólica de aguardentes. **FOCO: Caderno de Estudos e Pesquisas**, n. 11, p. 7-21, 2016.
- GOLDAMMER, T. **The brewer's handbook: a complete book to brewing beer**. Apex Publishers, 2022. Disponível em: <[https://www.beer-brewing.com/beer\\_brewing/beer\\_brewing\\_brewers\\_yeast/yeast\\_management.htm](https://www.beer-brewing.com/beer_brewing/beer_brewing_brewers_yeast/yeast_management.htm)> . Acesso em: 10 Fev 2024.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p.808- 810, 2007.
- GRAVES, T.; NARENDRANATH, N. V.; DAWSON, L.; POWER, R. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2006.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- KAMEI, Y.; TAMADA, Y.; NAKAYAMA, Y.; FUKUSAKI, E.; MUKAI, Y. Changes in transcription and metabolism during the early stage of replicative cellular senescence in budding yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 46, p. 32081-32093, 2014.

- KARA, B. V.; SIMPSON, W. J.; HAMMOND, J. R. M. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 94, n. 3, p. 153-158, 1988.
- KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 7, p. 1068-1079, 2014.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.; Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v.11, p. 641-649, 1981.
- LESUR, I; CAMPBELL, J. L. The transcriptome of prematurely aging yeast cells is similar to that of telomerase-deficient cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 3, p. 1297-1312, 2004.
- LIMA, U. A., BASSO L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. *In*: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, v. 3. Cap. 1, São Paulo: Editora Edgard. Blucher, p.1-40, 2001.
- LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. **Álcool carburante**: uma estratégia brasileira. Curitiba: Editora UFPR, p. 248, 2002.
- LIMA, J. M. **Leveduras não-Saccharomyces para produção de etanol em mostos de cana-de-açúcar: resistência ao estresse, potencial fermentativo e de crescimento em condições de reciclo celular e tratamento ácido**. 2024. Qualificação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados). Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2024.
- LIN, Y.; ZHANG, W.; LI, C.; SAKAKIBARA, K.; TANAKA, S.; KONG, H. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. **Biomass and bioenergy**, v. 47, p. 395-401, 2012.
- LIU, J.; YANG, L.; KJELLERUP, B. V.; XU, Z. Viable but nonculturable (VBNC) state, an underestimated and controversial microbial survival strategy. **Trends in Microbiology**, v. 31, n. 10, p. 1013-1023, 2023.
- LIU, X.; JIA, B.; SUN, X.; AI, J.; WANG, L.; WANG, C.; ZHAO, F.; ZHAN, J.; HUANG, W. Effect of initial pH on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 4, M800-M808, 2015.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. P.; CHERUBIN, R. A. GODOY, A; AMORIM-NETO, H. B. V. **Leveduras personalizadas® para a produção de etanol: seleção dirigida pelo processo**. Piracicaba: Fermentec, 2015. 42p.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; NETO, H. B. A.; AMORIM, H. V. Ethanol

- production in Brazil: a bridge between Science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 64-76, 2016.
- LORENZI, M. S. FermentecNews. 2021. Alternativa para o tratamento ácido do fermento. Disponível em: <<https://fermentecnews.com.br/page/7/>>. Acesso em: 03 Feb 2024.
- LUCENA, B. T. L.; SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L. S.; MOREIRA, A. P. B.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; MORAIS, M. A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 298–306, 2010.
- MARBÀ-ARDÉBOL, A. M.; EMMERICH, J.; MUTHIG, M.; NEUBAUER, P.; JUNNE, J. Real-time monitoring of the budding index in *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivations with in situ microscopy. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 73, 2018.
- MARTINS, C. T.; JACOBUS, A. P.; CONCEIÇÃO, R. J.; BARBIN, D. F.; BOLINI, H.; GOMBERT, A. K. Simultaneous enumeration of yeast and bacterial cells in the context of industrial bioprocesses. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 51, kuae029, 2024.
- MARTÍNEZ, J. L. A.; CÁRDENAS, G.; RUIZ, M.; GUSILS, C. Análisis comparativo de colorantes vitales en el estudio de la viabilidad de levaduras. **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán**, v. 93, n. 1, p. 39-42, 2016.
- MAGER, W. H.; SIDERIUS, M. N. insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 251-257, 2002.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MORAES, J. **Desenvolvimento e padronização do ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade de leveduras no contexto microcervejeiro**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2017.
- NARENDRANATH, N.V.; HYNWA, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W. M. Effects of lactobacilli on yeast- catalyzed ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.11, p.4158-4163, 1997.
- OLIVA-NETO, P.; DORTA, C.; CARVALHO, A. F. A.; LIMA, V. M. G; SILVA, D. F. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation – yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.) **Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments**. 1st ed. Badajoz, Formatex. v. 1, p. 371-379, 2013.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 1, p. 25-31, 1997.

- OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. 89p.
- PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características flocculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, MG, Brasil, 2010.
- PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V. E. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 32, p. 59-68, 2009.
- PEREIRA, F. B; GUIMARÃES, P. M.R.; TEIXEIRA, J. A; L, DOMINGUES. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 130-136, 2011.
- PINTO, D.; SANTOS, M. A.; CHAMBEL, L. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 61-76, 2015.
- RAGHAVENDRAN, V.; BASSO, T. P.; SILVA, J. B.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 7, p. 971-983, 2017.
- REIS, V. R.; ANTONANGELO, A. T. B. F.; BASSIA, A. P. G.; COLOMBIC, D.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. **brazilian journal of microbiology**, v. 48, n. 2, p. 268-274, 2017.
- REIS, V. R., BASSI, A. P. G.; SILVA, J. C . G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1121-1131, 2013.
- SALMA, M.; ROUSSEAU, S. GRAND, A. S.; DIVOL, B.; ALEXANDRE, H. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 8, n. 10, e77600, 2013.
- SANTOS, R. M.; NOGUEIRA, F. C. S.; BRASIL, A. A.; CARVALHO, P. C.; LEPREVOST, F. V.; DOMONT, G. B.; ELEUTHERIO, E. C. A. Quantitative proteomic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains CAT-1 and PE-2. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 114-121, 2017.
- SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. **Molecular Cell**, v. 1, n. 5, p. 639-648, 1998.

- SILVA, F. C.; CESAR, A. A.; DE-MORAIS, J.; VILELA, M.; MENDES, C. Diagnóstico hídrico em destilarias de álcool em São Paulo. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 1, n. 1, p. 93-117, 2011.
- SILVA-NETO, J. M.; COVRE, E. A.; ROSA, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Can ethanol partially or fully replace sulfuric acid in the acid wash step of bioethanol production to fight contamination by *Lactobacillus fermentum*?. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 2, p. 323-332, 2020.
- STEWART, G. G. Yeast viability and vitality. *In*: STEWART, G. G. **Brewing and distilling yeasts**. Cham: Springer, p. 147-165, 2017.
- TREVISOL, E. T. V.; PANEK, A. D.; MANNARINO, S. C.; ELEUTHERIO, E. C. A. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 697-704, 2011.
- WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 482–487, 1999.